

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ZUR
ISOHÄMAGGLUTININ-AKTIVITÄT DES ABO-SYSTEMS
UND IHRER ZUORDNUNG ZU DEN IMMUN-
GLOBULIN-KLASSEN IGA, IGG UND IGM

JOST HEINSIUS VON MAYENBURG

1970



Kurfürstendruck
Dipl.-Kfm. A. Koch
8 München 13 · Kurfürstenplatz 6
Fernsprecher 3421 49/39 99 38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Hygiene-Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. Dr. H. Eyer

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ZUR ISOHÄMAGGLUTININ-AKTIVITÄT
DES ABO-SYSTEMS UND IHRER ZUORDNUNG ZU DEN IMMUN-GLOBULIN-
KLASSEN IGA, IGG UND IGM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Jost Heinsius von Mayenburg

aus

Dresden

1970



Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. G. Schierz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. H. Eyer
Dekan:	Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 20.1.1970

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung und Begriffe	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Glossar	9
10. Index	10

Claudia gewidmet

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung und Begriffe	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Literaturverzeichnis	12
13. Anhang	13
14. Glossar	14
15. Index	15
16. Bibliographie	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Anhang	18
19. Glossar	19
20. Index	20
21. Bibliographie	21
22. Literaturverzeichnis	22
23. Anhang	23
24. Glossar	24
25. Index	25
26. Bibliographie	26
27. Literaturverzeichnis	27
28. Anhang	28
29. Glossar	29
30. Index	30
31. Bibliographie	31
32. Literaturverzeichnis	32
33. Anhang	33
34. Glossar	34
35. Index	35
36. Bibliographie	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Anhang	38
39. Glossar	39
40. Index	40
41. Bibliographie	41
42. Literaturverzeichnis	42
43. Anhang	43
44. Glossar	44
45. Index	45
46. Bibliographie	46
47. Literaturverzeichnis	47
48. Anhang	48
49. Glossar	49
50. Index	50
51. Bibliographie	51
52. Literaturverzeichnis	52
53. Anhang	53
54. Glossar	54
55. Index	55
56. Bibliographie	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Anhang	58
59. Glossar	59
60. Index	60
61. Bibliographie	61
62. Literaturverzeichnis	62
63. Anhang	63
64. Glossar	64
65. Index	65
66. Bibliographie	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Anhang	68
69. Glossar	69
70. Index	70
71. Bibliographie	71
72. Literaturverzeichnis	72
73. Anhang	73
74. Glossar	74
75. Index	75
76. Bibliographie	76
77. Literaturverzeichnis	77
78. Anhang	78
79. Glossar	79
80. Index	80
81. Bibliographie	81
82. Literaturverzeichnis	82
83. Anhang	83
84. Glossar	84
85. Index	85
86. Bibliographie	86
87. Literaturverzeichnis	87
88. Anhang	88
89. Glossar	89
90. Index	90
91. Bibliographie	91
92. Literaturverzeichnis	92
93. Anhang	93
94. Glossar	94
95. Index	95
96. Bibliographie	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Anhang	98
99. Glossar	99
100. Index	100

Inhalt

	Seite
A) Einleitung	1
B) Material und Methoden	5
I. Material	5
II. Methoden	6
1. Quantitative Bestimmung der Human-Isohämagglutinine	6
2. Trennung der Gamma-Globuline mittels präparativer Elektrophorese	6
3. Präparative Darstellung der Isohämagglutinine mit Erythrozyten-Stroma	7
a) Absorption	8
b) Desorption	8
ba) Wärmeisolierung kombiniert mit Immunelektrophorese	8
bb) Wärmeisolierung kombiniert mit Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY	9
c) Rückgewinnung desorbierten Antikörper aus dem Agar	9
ca) Methode	9
cb) Charakterisierung der isolierten Serumproteine	10
4. Verwendung von AB-Substanzen zur Isohämagglutinin-Darstellung	12
a) Untersuchung mit kommerziellen AB-Substanzen	12
b) Disaggregiertes Erythrozyten-Stroma als AB-Substanz	13
5. Trennung der Isohämagglutinine von anderen mit Stroma reagierenden Gamma-Globulinen des Serums	14
a) Beseitigung des Bindungsvermögens von Stroma für unspezifische Serumproteine	14
b) Versuche zur Differenzierung an Stroma gebundener unspezifischer Proteine von Isoagglutininen	15

	Seite
c) Isolierte Abtrennung der Isoagglutinine von Stromaadsorbat	16
C) Ergebnisse	21
I. Quantitative Bestimmung der Human-Isohämagglutinine	21
1. Gesamttagglutinine	21
2. Hämagglutinin-Titer nach Verlust des IgM-Anteils	31
II. Untersuchungen zur Differenzierung der drei Gamma-Globulin-Klassen der Isohämagglutinine	38
1. Isoagglutinin-Aktivität in verschiedenen elektrophoretisch getrennten Gamma-Globulin-Fraktionen	41
2. Versuche zur Isohämagglutinin-Darstellung mit AB-Substanzen	42
a) Untersuchungen mit käuflichen AB-Substanzen	42
b) Disaggregiertes Erythrozyten-Stroma als AB-Substanz	43
3. Präparative Darstellung der Isoagglutinine mit Erythrozyten-Stroma	44
a) Nachweis dissoziierter Proteine im Agar (Grundversuch)	44
b) Untersuchung der dissoziierten Proteine	46
c) Eigenschaften der Erythrozyten-Membran gegenüber Kaninchenserum	55
4. Trennung der Isoagglutinine von anderen mit Stroma reagierenden Gamma-Globulinen des Serums	57
a) Versuche zur Beseitigung der Affinität von Stroma zu unspezifischen Serumproteinen	58
b) Versuche zur selektiven Abspaltung der Isoagglutinine oder unspezifischen Gamma-Globuline	59
D) Diskussion	61
E) Zusammenfassung	80
F) Literatur	83

A) EINLEITUNG

Seit der Entdeckung der Blutgruppen durch K. LANDSTEINER im Jahre 1900 hat die Erforschung der Blutgruppen-Antikörper schnell große Fortschritte gemacht, so daß heute über die Natur der Isohämagglutinine weitreichende Erkenntnisse vorliegen. Einen wesentlichen Anteil daran hat die rasche Entwicklung der gesamten Immunologie gehabt. Im Jahre 1900 sprach LANDSTEINER von der "agglutinierenden Wirkung des Globulins" (Rinderserum-Meerschweinchenerythrozyten). GRÖNWALL (1935) bestimmte die Isoagglutinine in mehreren mit 30% Ammon.-Sulfat ausgefällten Human-Globulin-Fraktion. COHN fand 1944 bei der Fraktionierung der Plasmaproteine die Hämagglutinine in der Fraktion III-1 (fast alle anderen Antikörper in Fraktion II) des Gamma-Globulins. Er gibt ihre Durchschnittsmenge mit 0,03/100g Plasma an. Dieser äußerst geringe Anteil an den Gamma-Globulinen einerseits und das Problem der Reindarstellung andererseits waren immer Schwierigkeiten, die bei Untersuchungen der Isohämagglutinine eine wichtige Rolle spielten. Als in der Folgezeit die Gamma-Globuline hinsichtlich ihrer Molekulargewichte untersucht und die drei Klassen der Immunglobuline entdeckt wurden, konnte das Wissen über die Natur der Isohämagglutinine wesentlich erweitert werden. In den ersten Untersuchungen fanden sich Isoagglutinine mit den Sedimentationskonstanten 7S (Molekulargewicht 180 000) (DEUTSCH, 1947) sowie um 20S (PEDERSEN, 1945). McDUFFY (1958) sowie RAWSON und ABELSON (1959) äußerten die Vermutung, daß außer diesen beiden, den Gamma-Globulinen γ_{SS} (IgG) und γ_1 M (IgM) angehörenden Agglutininen, ein dritter Isohämagglutinintyp vorhanden sei. KUNKEL und ROCKEY (1963) sowie RAWSON und ABELSON (1964) isolierten eine Isoagglutininfraktion mit einer Sedimentationskon-

stanten, die zwischen 7S und 19S liegen sollte und wiesen ihre Zugehörigkeit zu den Gamma-Globulinen β 2A (IgA) nach. Die gleichen Autoren zeigten, ebenso wie ISHIZAKA (1965), daß alle Anti-A und Anti-B-haltigen Seren Isohämagglutinine der 3 Klassen IgA, IgG und IgM aufweisen.

Nachdem der qualitative Nachweis der Anwesenheit der drei Gamma-Globulin-Fraktionen in den Isohämagglutininen erbracht wurde, interessiert jetzt die Frage der quantitativen Anteile der drei Klassen an der Gesamttagglutinin-Aktivität. Dieser Frage gehen die hier unternommenen Untersuchungen nach. In einem ersten Teil der Arbeit wurde der Anteil der Gamma-Globulin-Fraktion IgM an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität in einem annähernd quantitativem Verfahren bestimmt. Grundlage für diesen Versuch ist die Thermolabilität des Makroglobulins IgM, das bei einer Temperatur von 65° C seine immunologische Aktivität verliert (JOHNSON und HOLBOROW 1961, SCHIERZ 1967). An einer großen Anzahl von Seren wurde zunächst der Gesamttagglutinin-Titer im Reihenverdünnungstest ermittelt, sodann der Titer nach Wärmeinaktivierung. Im Vergleich sollte gezeigt werden, welche Unterschiede in der IgM-Aktivität zwischen Seren unterschiedlicher Gesamttiter, sowie zwischen den Seren der drei Agglutinin-haltigen Blutgruppen A, B und O auftreten. Dabei interessierte vor allem, ob eine Korrelation zwischen IgM-Aktivität und individueller Gesamttiterhöhe, sowie zwischen IgM-Aktivität und den unterschiedlichen mittleren Gesamttitern der Blutgruppen A, B und O besteht.

Die anschließenden Untersuchungen im 2. Teil der Arbeit hatten zum Ziel, über den Vergleich der agglutinierenden Aktivitäten der drei Gamma-Globulin-Klassen hinaus die drei Komponenten der Hämagglutinine exakt zu bestimmen. Dazu mußte eine Versuchstechnik gefunden werden, die zwei

entscheidende methodische Probleme löste: Einerseits die selektive und vollständige Absorption der Isohämagglutinine aus dem Serum, zum anderen die schonende und vollständige Eluation der absorbierten Antikörper. In den vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene AB-Substanzen sowie Human-Erythrozyten-Stroma als spezifisches Immunoabsorptions-Material für Isohämagglutinine erprobt, sowie die Methode der thermischen Dissoziation zur Spaltung des Agglutinin-Stroma-Komplexes angewendet.

Der Versuch zur Entwicklung einer einfachen Methodik zum qualitativen, besonders aber auch zum quantitativen Nachweis der drei Gamma-Globulin-Klassen der Isohämagglutinine wurde unter anderem mit besonderem Hinblick auf die praktische Bedeutung für die Klinik unternommen. Die Immunglobuline mit den drei großen Fraktionen IgA, IgG und IgM bestehen mit Ausnahme der Isoagglutinine im wesentlichen aus den antiinfektiösen Antikörpern. Beim Antikörper-Mangel-Syndrom (AMS) ist die Bildung dieser Immunglobuline gestört.

Eine besondere Form des AMS liegt vor, wenn mit den üblichen Methoden der Immunelektrophorese der Nachweis eines Defizits der Gamma-Globuline oder einer der drei Fraktionen nicht erbracht werden kann, trotzdem aber die Symptome dieser Krankheit bestehen. In solchen Fällen geht die Bildung der Immunglobuline quantitativ vollständig vonstatten, während ein Defekt in der Ausbildung der spezifischen Antikörper-Aktivität in einer oder in mehreren Immunglobulinklassen besteht. Für die Aufklärung dieses Defekts genügt demnach nicht allein der Nachweis der Anwesenheit der drei Immunglobulinklassen, sondern eine Prüfung der drei Fraktionen hinsichtlich ihres Antikörpercharakters wird notwendig. Mit den Isohämagglutininen stehen Gamma-Globuline zur Verfügung, die in der Hämagglutination deutlich

ihren Antikörper-Charakter manifestieren. Außerdem liegt der günstige Umstand vor, daß die Hämagglutinine in den drei großen Immunglobulin-Klassen vertreten sind und sich somit ausgezeichnet dazu eignen, die Antikörper-Wirksamkeit der drei Immunglobulin-Typen nachzuweisen.

B) MATERIAL UND METHODEN

I. Material

Aus dem Einsendungsgut der serologischen Abteilung des Max. v. Pettenkofer-Institutes für Hygiene der Universität München stand Patientenblut aus verschiedenen Kliniken des Münchner Raumes nach Abschluß der serologischen Untersuchungen zur Verfügung. Nach Eingang des Materials wurden sofort jeweils 1 - 4 ml Serum abzentrifugiert, bei 56° C Komplement-inaktiviert und für etwa 1 Woche im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Die Erythrozyten aus den gleichen Blutproben wurden mit physiologischer NaCl-Lösung 3mal ausgewaschen und nicht länger als 2 Tage im Kühlschrank bei 4° C aufgehoben. Größere Blutmengen (200-300 ml) aus nicht aufgebrauchten Konserven stellte die Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik zur Verfügung. Das mit ACD-Stabilisator versetzte Blut wurde nach 2 - 21 Tagen (Spendetermin bis Serum-Abtrennung) abzentrifugiert, die Erythrozyten sofort verwendet und das Plasma bei - 20° C tiefgefroren. Um eine langsame Ausflockung von Fibrin zu vermeiden, wurde nach Auftauen des Plasmas durch Zugabe von Calcium-Ionen das Fibrin ausgefällt und vom Serum abzentrifugiert.

Für einige Untersuchungen stand frisches Spenderblut (50 ml) zur Verfügung.

II. Methoden

1. Quantitative Bestimmung der Human-Isohämagglutinine

Der zur quantitativen Isohämagglutinin-Bestimmung angewendete Reihenverdünnungstest entsprach der in der Blutgruppenserologie viel benutzten Testanordnung, die im Prinzip von WIDAL 1896 und FOERSTER 1897 entwickelt wurde und zur Hämagglutinin-Bestimmung von MOLLISON 1961 und SALOMON 1965 beschrieben wird. In 10 Reagenzgläser (10 x 100 mm) wurden je 0,2 ml phosphatgepufferte NaCl-Lösung PH 7,2 eingebracht, mit 0,2 ml Serum eine geometrische Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:1024 hergestellt und jedem Röhrchen eine 2%ige Testblutkörperchen-Suspension der entsprechenden Blutgruppe zugesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur und Zentrifugieren mit 3500 U/Min (Zentrifuge: Ecco-superior-II b) für 2 Minuten wurde der Endtiter durch Betrachten der Röhrchen von der Unterseite her und durch leichtes Beklopfen ermittelt. Von jedem Serum erfolgten nacheinander zwei Titerbestimmungen mit gleichen Testerythrozyten: Zunächst mit unverändertem inaktivierten Serum zur Bestimmung des Gesamt-Isohämagglutinin-Titers; und darauf mit dem gleichen Serum nach Aufheben der Reaktionsfähigkeit der IgM-Fraktion durch Erwärmen auf 64° C für 30 Minuten. Die Untersuchung fand in den Monaten November bis April an 90 Seren der Gruppen A, B und O statt.

2. Trennung der Gamma-Globuline mittels präparativer Elektrophorese

Zur Auftrennung der Serum-Proteine nach der Makromethode der Gel-Elektrophorese wurde eine Glasplatte (9 x 12 mm) 3,5 mm hoch mit 1,5%igem Agar (Difco-Nobel-Agar) in 0,05 m

Veronalpuffer PH 8,2 beschichtet. In ein 10 cm langes Reservoir wurde das Serum nach Verdünnen mit Aqua de-ionisata 3:5 und Mischen mit Agar 1:2 eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte unter einer Spannung von 60 Volt, 130 Min. lang. Danach wurde vom Rand der Agarplatte eine streifenförmige Probe herausgeschnitten und mit 2%iger Trichloressigsäure fixiert. Nach der aus dem Probeschnitt ersichtlichen Position der Globuline wurden 5 einzelne Fraktionen aus dem Agar herausgeschnitten, bei -20°C eingefroren und während des Auftauens im Röhrchen mit einem Spatel ausgepreßt. Von den 5 Proteinlösungen wurden Immunelektrophoresen (mit Anti-Human-Serum vom Pferd, Institut Pasteur Nr. 223) und Isohämagglutinin-Bestimmungen durchgeführt.

3. Präparative Darstellung der Isohämagglutinine mit Erythrozyten-Stroma

Nach einer von F.A. GREEN 1965 beschriebenen Methode zur Stroma-Herstellung wurden 3mal gewaschene Erythrozyten in 8 Vol. Aqua destillata suspendiert, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 4mal in 8 Vol. Aqua destillata bei 10 000 U/Min 30 Minuten lang nahezu hämoglobinfrei gewaschen (Zentrifuge: Sorvall superspeed RC 2-B). Die entstandene braun-rote Paste wurde sofort verwendet oder für einige Tage bei 4°C mit Zusatz von 1% Merthiolat im Kühlschrank aufgehoben. Längere Konservierung erfolgte durch Tiefrieren (-20°C) oder Lyophilisieren (F.A. GREEN 1967). Gefriergetrocknetes Material konnte jederzeit mit wenigen Tropfen physiol. NaCl-Lösung unter Verreiben im Mörtel in feiner Verteilung resuspendiert werden. 100 cm^3 Erythrozyten-Sediment ergab 1,013 g lyophilisiertes Stroma, 200 cm^3 Erythrozyten-Sediment 15 cm^3 scharf zentrifugiertes Stroma-Sediment.

a) Absorption

Das Verhältnis Stroma : Serum wurde nach den zur Verfügung stehenden Materialmengen so bestimmt, daß der Serumanteil weit überwog (1:5 bis 1:30). Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur und im Brutschrank (37°C) unter häufigem Aufschütteln 2 und 3 Stunden lang. Danach wurde abzentrifugiert und das Serum auf seine Rest-Agglutinin-Aktivität hin getestet. Der Waschvorgang in physiologischer NaCl-Lösung (Zentrifugation 1400 U/Min, später mit niedrigerer Tourenzahl, 30 Minuten lang) wurde 3mal, in einigen Fällen auch 4-6mal wiederholt zur Entfernung vor allem auch zellgebundenen Fremdproteins.

b) Desorption

ba) Wärmeisolierung kombiniert mit Immunelektrophorese

Das Prinzip der Wärmetrennung des Stroma-Isohämagglutinin-Komplexes beruht auf der Erkenntnis von LANDSTEINER und MILLER (1925), daß sich Blutgruppen-Antikörper von ihrem Antigen bei einer Temperatur über 50°C lösen. Die Wärmeisolierung wurde im Agar-Gel mit einer Immunelektrophorese kombiniert mit dem Ziel, die abgelösten Antikörper im gleichen Agar nachzuweisen. Zur Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1955) wurde eine 9 x 12 mm große Platte, 3,5 mm hoch mit 1,5%igem Difco-Nobel Agar (Veronalpuffer Ph 8,2) beschichtet und mit zwei 5,5 cm langen Rinnen (Abstand 5 cm) versehen. Ein 0,3 mm weites Reservoir (Abstand 4 mm von der einen Rinne) wurde mit Stroma-Material, ein 0,2 mm weites (Abstand 2,5 mm von der anderen Rinne) mit dem Ausgangsserum gefüllt und die Apparatur im Brutschrank bei 56°C aufgestellt (MILGROM 1965). Die Elektrophorese-Dauer bei 40 Volt Spannung betrug 130 Minuten. Als Antiserum diente das Anti-Human-Serum vom Pferd (223).

Bei dieser Versuchsanordnung ergaben sich Schwierigkeiten der Temperatur-Konstanz infolge der elektrophoretisch bedingten Wärmebildung.

bb) Wärmeisolierung kombiniert mit Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY

Bei dieser Versuchsanordnung werden die auf der Agar-Gel-Platte unter Wärme abgelösten und in den Agar hineindiffundierten Antikörper mit dem Agar-Gel-Diffusionstest (AGD-Test) nach OUCHTERLONY (1957) nachgewiesen. Ein Objektträger wurde mit 2,0 ml 1%igem phosphatgepufferten Agar (PH 7,2) beschichtet. Um ein zentrales, 5 mm weites Reservoir wurden im Abstand von 5 mm 4 kleinere 3 mm weite Löcher gruppiert. Das mittlere wurde mit Stroma-Absorbat gefüllt, der Objektträger für 5 Stunden im Brutschrank bei 56° C inkubiert und nach Auffüllen der kleinen Reservoire mit Antiseren für 36 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zum Nachweis der drei Immunglobulinklassen IgA, IgG und IgM fanden monospezifische Antiseren vom Kaninchen der Fa. Behring Verwendung: "Antiγ A-, Antiγ G-, Antiγ M-Globulin-Serum vom Kaninchen". Zusätzlich wurde als polyvalentes Antiserum das Human-Serum vom Pferd (Serum 223) benutzt.

c) Rückgewinnung desorbierter Antikörper aus dem Agar

ca) Methode

Um quantitativ nachweisbare Isohämagglutinin-Mengen aus dem Agar zurückzugewinnen zu können, mußten größere Serum- und Stroma-Volumina (Konservenblut) herangezogen und die Agarfläche vergrößert werden. Eine 9 x 12 cm große, 4 mm hoch mit oben genanntem Agar beschichtete Platte wurde

mit acht 5 mm weiten Löchern versehen, mit etwa 1 ml Stroma-Adsorbat aufgefüllt und für 5 Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 56° C aufgestellt. In späteren Versuchen wurden 2 Platten mit je drei 10 cm langen Rinnen mit 2,5 ml Stroma-Adsorbat gefüllt. Eine Verbesserung der Lösungsbedingungen brachte die Verwendung eines Wasserbades von 52° C, in das die Agarplatte in einer feuchten Kammer für 90 Minuten eingebracht wurde. Nach 48 Stunden Diffusion bei Zimmertemperatur wurde der Agar vorsichtig unter Zurücklassen der von Stromamaterial verunreinigten Umgebung der Reservoirs abgehoben, bei - 20° C tiefgefroren, langsam wieder aufgetaut und dabei mit einem Spatel ausgepreßt. Die Einengung der so gewonnenen Lösung auf 1,5 ml geschah zunächst nach Dialyse gegen 1:10 verdünnten Veronalpuffer PH 8,2 mit dem Dialyse-Schlauch bei 4° C an der Luft und durch Aquax, später mit Ultrafiltration mit Membranfilter LSG 60 (Sartorius). Die Kontrolle des Versuchsablaufs erfolgte mit gleichem Material unter gleichen Bedingungen im AGD-Test und auf einem Agarstück, welches auf einem vorher in die Agar-Platte eingegossenen Deckgläschen herausgeschnitten wurde mit der OUCHTERLONY-Technik.

cb) Charakterisierung der isolierten Serumproteine

Die Untersuchung der desorbierten Proteine geschah mit folgenden Methoden:

Objektträger-Agglutination mit 2%igen Suspensionen von Testblutkörperchen beider Blutgruppen A und B .

Titerbestimmung im Reihenverdünnungs-Test mit der unter 1) beschriebenen Methode.

OUCHTERLONY-Test in der oben beschriebenen Anordnung der Reservoirs unter zusätzlicher Verwendung der Test-Seren

"Anti-Human-Serum" und "Anti-Albumin-Serum" vom Kaninchen der Fa. Behring.

Elektrophorese im Agargel auf dem Objektträger (1,5%iger 0,05 m Veronalpuffer-Agar PH 8,2, 1 Stunde bei 40 Volt).

Immunelektrophorese auf einem in gleicher Weise beschichteten Objektträger (1 Stunde, 40 Volt) gegen das Anti-Human-Serum vom Kaninchen.

Ferner wurde die Eiweißkonzentration mit Biuretreagenz nach DITTEBRANDT (1948) bestimmt. Zum Nachweis der drei Gamma-Globulin-Komponenten in der gewonnenen Protein-Lösung wurde ein Verfahren auf der Grundlage des Coombs-Tests angewendet.

Erythrozyten, die der Blutgruppe der Agglutinine in der gewonnenen Protein-Lösung entsprachen, wurden so weit unterschwellig mit diesen beladen, daß sie gerade noch keine Agglutination herbeiführten. Durch Zusatz der monospezifischen Antiseren Anti γ A, Anti γ G und Anti γ M in getrennten Versuchen sollten die drei Klassen der Blutgruppenantikörper durch Agglutination nachgewiesen werden. In einer geometrischen Verdünnungsreihe mit kleinen Titerintervallen von 1:2, 1:3, 1:5 bis 1:80 wurde die Lösung verdünnt, mit 0,2 ml 2%iger Erythrozytensuspension 30 Minuten bei Zimmertemperatur und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und das erste Röhrchen ohne Agglutinate bestimmt. Mit einem Tropfen der 3mal gewaschenen Erythrozyten aus diesem Reagenzglas und 2 Tropfen des spezifischen Antiglobulinserums erfolgte bei Zimmertemperatur auf dem Objektträger der Agglutinationstest.

Weiterhin wurde im OUCHTERLONY-Test versucht, die Hämagglutinine in der Protein-Lösung mit Blutgruppensubstanzen zu präzipitieren. Dazu wurden die unten aufgeführten kommerziellen Substanzen, ein aus Erythrozyten-Stroma mit Duodecylsulfat-Natrium präpariertes Substrat, sowie Papain- bzw. Trypsin-behandeltes Stroma verwendet.

4. Verwendung von AB-Substanzen zur Isohämagglutinin-Darstellung

a) Untersuchungen mit kommerziellen AB-Substanzen

Zwei kommerzielle AB-Substanzen standen zur Verfügung: "Bloodgroup specific substances A and B (N F.)" der Fa. Merck, Sharp & Dohme, sowie "Neutr. AB" der Fa. Dade, bezogen über die Asid-Werke. Als Testseren dienten die staatlich geprüften Immunseren zur Blutgruppenbestimmung "Anti-A" und "Anti-B" der Firmen Asid und Behring. Plasma der Blutgruppe O, Anti-A-Titer 1:128 (Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik), wurde vor der Untersuchung durch Zugabe einer äquivalenten Calcium-Menge von Fibrinogen befreit.

Zur Untersuchung in der AGD wurde zunächst auf mit gewöhnlichem 1%igem Agar beschichteten Objektträgern ein zentrales 5 mm weites Reservoir mit den Antiseren Anti-A bzw. Anti-B gefüllt und im Abstand von 5 mm in vier 3 mm weite Reservoirs die jeweilige AB-Substanz in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 eingebracht. AB-Substanzen und Testseren aller genannten Hersteller wurden ausprobiert. Später wurde der gleiche Versuch in einem Kolloid-Agar wiederholt. 0,2 ml einer 35%igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit dem Molekulargewicht 40 000 (von Fa. Serva bezogen) wurde bei etwa 50° C zu 20 ml eines flüssigen 1%igen Agars gegeben und der entstandene 0,35%ige Kolloid-Agar auf Objektträger ausgegossen.

In einem weiteren Versuch sollte AB-Substanz zur Absorption von Isoagglutininen verwendet werden. Als Vorversuch zur Prüfung einer sichtbaren Präzipitation erfolgte eine tropfenweise Zugabe von AB-Substanz zu 1 ml Serum. Bei Ausbleiben sichtbarer Präzipitate wurde die Serumverdün-

nung erhöht, so daß eine Verdünnungsreihe der AB-Substanz von 1:6 bis 1:26 entstand. Zur Absorption wurden 10 ml Serum mit 1,5 ml "Neutr. AB" 90 Minuten im Brutschrank bei 37° C und anschließend 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C inkubiert. Bei 10000 U/Min wurde das Material 35 Minuten lang zentrifugiert und 3mal unter gleichen Rotationsbedingungen ausgewaschen. Unter tropfenweiser Zugabe von AB-Substanz zum Sediment und anschließender Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sollte durch Antigen-Überschuß eine Ablösung der Antikörper erfolgen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in der AGD und Gel-Elektrophorese untersucht.

b) Disaggregiertes Erythrozytenstroma als AB-Substanz

Nach Angaben von F.A. GREEN (1967) über "Löslichmachen oder Disaggregation von Erythrozyten-Membranen mit Detergentium" erfolgte die Behandlung von Stroma mit Duodecylsulfat-Na-Salz, $C_{12}H_{25}OSO_3$ (Fa. Serva Kennzeichnung "reinst, kristallin, salzfrei > 99%"). Bei Herstellung der vorgeschriebenen 2%igen 0,05 m phosphatgepufferten Duodecylsulfatlösung, PH 7,6, trat ein störender Niederschlag auf, ebenso bei Konzentrationen von 1,5% und 1% Duodecylsulfat. Der Phosphatpuffer wurde deshalb durch einen Veronalpuffer ersetzt und eine 2%ige Duodecylsulfatlösung, PH 7,6, hergestellt. Diese Lösung wurde tropfenweise lyophilisierten Erythrozyten-Membranen zugesetzt, die Stroma-Partikel im Mörser zerrieben und durch Zugabe von Duodecylsulfat-Lösung Suspensionen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Das Material wurde jeweils 4 bzw. 16 Stunden bei Zimmertemperatur oder 48 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Zum Nachweis einer dabei abgelösten präzipitierenden AB Substanz diente das OUCHTERLONY-Test-System. Objektträger wurden mit dem bereits genann-

ten Agar sowie mit 1%iger phosphatgepufferter Agarose, PH 7,2 und mit einem 1%igen Difco-Nobel-Agar, der in der 2%igen veronalgepufferten Duodecylsulfatlösung PH 7,2 gelöst wurde, beschichtet. Nach Füllen eines 3 mm weiten Reservoirs mit dem präparierten Stroma und eines 5 mm weiten Reservoirs mit Antiserum Anti-A bzw. Anti-B (Abstand 5 mm), erfolgte die Inkubation für 40 Stunden bei Zimmertemperatur.

5. Trennung der Isohämagglutinine von anderen mit Stroma reagierenden Gamma-Globulinen des Serums

a) Beseitigung des Bindungsvermögens von Stroma für unspezifische Serumproteine

Zur Ausschaltung der unspezifischen Bindung von Serum-Proteinen wurde das zur Adsorption dienende Stroma mit Hilfe peptischer Fermente vorbehandelt. Die bindenden Gruppen am Stroma sowie bereits fixiertes Protein sollten dabei unwirksam gemacht werden. Drei Fermentlösungen wurden hergestellt und mit einer dickflüssigen Stromasuspension in folgenden Volumverhältnissen aufgeschwemmt:

0,5 ml Stromasuspension in 5 ml 0,3%iger Papainlösung,

0,6 ml Stromasuspension in 6 ml 0,3%iger Papainlösung + 0,6 ml 0,5 m Cysteinlösung,

0,8 ml Stromasuspension in 1/2%iger Trypsin-Glycin-Pufferlösung, PH 8,2.

Als Grundsubstanzen dienten "Papain 12 000 E/g, Eialbumin-Verdünnungsvermögen 1:350" und "L(+)-Cysteiniumchlorid" der Fa. Merck sowie "Trypsin 1:250" der Difco laboratories Detroit. Das Material wurde dann für 1/2 Stunde, 1 und 2 Stunden unter häufigem Aufschütteln in ein Wasserbad von 37° C gebracht, dann abzentrifugiert und das Sediment 2mal in physiologischer NaCl-Lösung ausgewaschen. Aufschluß

über die erreichte Proteinfreiheit des Materials gab die oben beschriebene Methode der Wärmeisolierung und AGD von Proteinen unter gleicher Anordnung der Antiserum-Reservoirs. Von den drei 2 Stunden lang fermentativ behandelten Proben wurden dann Absorptionsversuche mit einem AB-Serum durchgeführt (Verhältnis 1:8). Die Inkubation erfolgte 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur, dann wurde das Material 5mal ausgewaschen und mit eben beschriebener Methode auf absorbierte Proteine untersucht. Parallelversuche wurden mit in gleicher Weise behandelten Erythrozyten durchgeführt, um das Bindungsvermögen für Isoagglutinine zu testen.

b) Versuche zur Differenzierung an Stroma gebundener unspezifischer Proteine von Isohämagglutininen

Vor der Absorption war es zunächst zweckmäßig, ein proteinfreies Stroma zu gewinnen. Dazu wurde das Stroma im Verhältnis 1:8 in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert, für 1 Stunde in ein Wasserbad von 64° C gebracht und anschließend unverzüglich abzentrifugiert. Mit der Methode der Wärmeisolierung und AGD konnte im Vergleich zu unbehandeltem Stroma eine Aussage über die Reinheit des Materials gemacht werden. In einem zweiten Schritt wurde dann gereinigtes Stroma mit entsprechendem Serum inkubiert und dabei die Zeiten auf 15 bzw. 30 Minuten bei 5° C beschränkt (Isohämagglutinine werden schneller gebunden als unspezifische Gamma-Globuline). Außerdem wurde nach Auswaschen (4mal mit 50 Vol. physiol. NaCl-Lsg.) das Stromaabsorbat mehrmals für 24 Stunden in 280 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert mit dem Ziel, die leichter dissoziierenden unspezifischen Proteine abzutrennen und die immunologisch gebundenen Hämagglutinine am Stroma zu halten.

c) Isolierte Abtrennung der Isoagglutinine von
Stromaadsorbat

Nach einer Methode von KAPLAN und KABAT (1966) zur Abtrennung der Blutgruppenantikörper von einer besonders präparierten AB-Substanz mit N-Acetyl-Galactosamin wurde ein Versuch zur isolierten Desorption der Hämagglutinine vom Stroma-Absorbat unternommen. Von der Substanz N-Acetyl-Galactosamin (Gal N Ac, Summenformel $C_8H_{15}NO_6$, über Fa. Serva bezogen, Kennzeichnung "reinst"), wurden 40 mg in 0,3 ml 1/1000 m phosphatgepufferter NaCl-Lösung aufgelöst. Darin wurde die absorbierte Stromamasse in einer Verdünnung von 1:3 suspendiert und nach den Angaben von KAPLAN und KABAT bei 37° C 1 Stunde lang und anschließend über Nacht bei 4° C unter Rühren inkubiert. Mit Hilfe der AGD-Technik wurde versucht, abgelöste Antikörper nachzuweisen (Anordnung der Reservoirs und Antiseren wie beschrieben).

Tabelle 1: Isoagglutinititer vor und nach Inaktivierung der IgM Fraktion von 90 Seren der Blutgruppen A, B und O. Klinische Diagnosen von Kliniken angegeben (m = männlich, w = weiblich)

Nr.	Ge- schlecht	Alter	56° C	65° C	Titer- ab- fall	Klinische Diagnose
Blutgruppe O						
1	m	14	Anti A 1:4 (8) Anti B 1:32	1:2 1:8	1 (2) 2 (1)	rheumat. Arthritis
2	m	35	Anti A 1:32 Anti B 1:16	1:16 1:4	1 2	-
3	m	56	Anti A 1:32(16) Anti B 1:16	1:8 1:4	2 2	Posthepatitis
4	m	30	Anti A 1:32 Anti B 1:16	1:16 1:8	1 1	-
5	m	4	Anti A 1:16 Anti B 1:32	1:16 1:16	0 1	-
6	m	2 1/2	Anti A 1:32 Anti B 1:32	1:4 (8) 1:4 (8)	3 (2) 3 (2)	rheumat. Arthritis
7	m	75	Anti A 1:64 Anti B 1:8	1:16 1:2	2	Anämie
8	m	31	Anti A 1:64(128) Anti B 1:16	1:32(16) 1:8	1 1	Virusinfekt
9	m	50	Anti A 1:64(128) Anti B 1:32(64)	1:32 1:4 (8)	1 (2)	Thrombophle- bitis migrans
10	m	37	Anti A 1:64 Anti B 1:64(128)	1:64 1:64	0 0	-
11	m	50	Anti A 1:64 Anti B 1:128	1:32 1:64	1 1	Infekt
12	m	15	Anti A 1:64 Anti B 1:128	1:16(32) 1:16(32)	2 (1) 3 (2)	Tiefe Thrombose li. Bein
13	m	48	Anti A 1:128 Anti B 1:32	1:16 1:2	3 4	-
14	m	33	Anti A 1:128 Anti B 1:16	1:32(16) 1:4	2 2	Iritis li.
15	m	25	Anti A 1:256 Anti B 1:128	1:64(128) 1:32(64)	2 2	-
16	w	76	Anti A 1:32 Anti B 1:64	1:16 1:32	1 1	Temperaturen
17	w	15	Anti A 1:64 Anti B 1:8	1:32 1:2	1 2	rheumat. Arthritis

Nr.	Ge- schlecht	Alter	56° C	65° C	Titer- ab- fall in Stufen	Klinische Diagnose
18	w	44	Anti A 1:64 Anti B 1:32	1:8 1:4 (8)	3 (2) 3 (2)	Durchfälle
19	w	17	Anti A 1:64 Anti B 1:32(64)	1:16 1:8(16)	2 2	Adenoide
20	w	65	Anti A 1:64 Anti B 1:64(128)	1:8 1:16	3 2 (3)	Herzfehler
21	w	27	Anti A 1:64(128) Anti B 1:64	1:4 (8) 1:32(16)	4 1 (2)	-
22	w	36	Anti A 1:64(128) Anti B 1:128	1:32 1:16(32)	1 (2) 3 (2)	Periphlebitis
23	w	35	Anti A 1:128(256) Anti B 1:16	1:64 1:2	1 (2) 3	angeblich Paratyphus
24	w	62	Anti A 1:128 Anti B 1:32	1:32(16) 1:8 (4)	2 (3) 2 (3)	Perniciosa
25	w	40	Anti A 1:128 Anti B 1:64	1:32 1:4 (8)	2 4 (3)	Iritis
26	w	42	Anti A 1:128 Anti B 1:64	1:32 1:16	2 2	Zust. nach sept. Temp.
27	w	28	Anti A 1:128 Anti B 1:256	1:16 1:4	3 6	Tuberculose
28	w	23	Anti A 1:256 Anti B 1:64	1:64 1:32(16)	2 1 (2)	Verd. auf Myocarditis
29	w	31	Anti A 1:256 Anti B 1:128(256)	1:64 1:32	2 2 (3)	Schlafmittel- vergiftung
30	w	46	Anti A 1:256 Anti B 1:256	1:128 1:64	1 2	-

Blutgruppe A (Anti B)

31	m		Anti B 1:8	1:4	1	
32	m	66	Anti B 1:8	1:4 (2)	1 (2)	Chron. Nephro- pathie

Ge- schlecht	Alter	56° C	65° C	Titer- ab- fall	Klinische Diagnose
m	40	Anti B 1:8	1:4	1 (0)	Septumresektion
m	58	Anti B 1:8	1:4 (2)	1 (2)	-
m	54	Anti B 1:16	1:4	2	atyp. Pneumonie
m	43	Anti B 1:16	1:8 (4)	1 (2)	fragl. Malabsorp- tions-S.
m	2	Anti B 1:16(32)	1:4	2 (3)	Blutungsneigung
m	10	Anti B 1:32	1:8	2	rheum. Arthritis
m	32	Anti B 1:32(16)	1:8	2 (1)	M. Bürger
m	16	Anti B 1:32(16)	1:8	2 (1)	Verd.a.Mononucleose
m	43	Anti B 1:32 (4)	1:4 (8)	3	Halslymphom
m	62	Anti B 1:64(32)	1:16(8)	1	-
m	31/2	Anti B 1:128	1:32(64)	2 (1)	-
w	26	Anti B 1:8	1:2 (4)	2 (1)	Verd.a.Pyelone- phritis
w		Anti B 1:8	1:2 (4)	2 (1)	
		Anti B 1:16	1:4	2	
		Anti B 1:16(32)	1:4 (8)	2	
w	53	Anti B 1:16	1:4	2	Verd. auf Lues
w	61	Anti B 1:16	1:4 (3)	1 (2)	Verd. a. Magen-Ca
w	21	Anti B 1:32	1:8(16)	2 (1)	Cholecystitis, abgelauf. Tbc
w	19	Anti B 1:32	1:8	2	akute Leukose
w	41	Anti B 1:32	1:8	2	-
w	3	Anti B 1:32(64)	1:8(16)	2	rheum.luet. Prozeß cerebral
w	47	Anti B 1:64(128)	1:16(32)	2	Uterus-Ca, Diabetes mellitus
w	44	Anti B 1:64	1:4 (8)	4 (3)	-
w	48	Anti B 1:64(128)	1:64	0 (1)	-
w	22	Anti B 1:64(128)	1:8	3 (4)	Contusio bulbi
w	42	Anti B 1:128	1:64	1	Myocarditis
w	42	Anti B 1:128	1:32(64)	2 (1)	unklare Ober- bauchbeschwerden
w	52	Anti B 1:128	1:32	2	-

Nr.	Ge- schlecht	Alter	56°C	65° C	Titer- ab- fall	Klinische Diagnose
Blutgruppe B, Anti A						
61	m		1:32	1:4 (2)	3 (4)	-
62	m	62	1:32 (64)	1:4	3 (4)	Polyarthrititis, Kollagenose
63			1:64 (32)	1:16	2 (1)	-
64	m	56	1:64(128)	1:16	2 (3)	Ösophagus-Ca
65	m	25	1:64 (32)	1:16	2 (1)	Verd.a. M. Bang
66	m	8	1:64(128)	1:16	2 (3)	-
67	m		1:64(128)	1:16 (8)	2	-
68	m	1 1/2	1:64(128)	1:64	0 (1)	-
69	m	23	1:128	1:16(32)	3 (2)	-
70	m	45	1:128(64)	1:32	2 (1)	-
71	m	40	1:128(64)	1:32(16)	2 (3)	-
72	m	19	1:128(256)	1:64	1	-
73	m	23	1:256(512)	1:128	1	M. Boeck
74	m	48	1:512(256)	1:128(256)	2 (1)	Bronchial-Ca
75	w	56	1:32	1:4	3	-
76	w	45	1:32	1:8	2	-
77	w	1	1:32	1:8	2	Enteritis
78	w	41	1:32	1:8	2	Magenulcus
79	w	22	1:32	1:8	2	-
80	w	20	1:32	1:16	1	Lues durchgemacht
81	w		1:64	1:8	3	-
82	w	23	1:64	1:16 (8)	2 (3)	Parainf. Prozeß
83	w	27	1:64	1:16 (8)	2 (3)	-
84	w		1:64(128)	1:16(32)	2	-
85	w	50	1:128(256)	1:8	4 (5)	Panmyelopathie
86	w		1:128(256)	1:16(32)	3	-
87	w	52	1:128(64)	1:32 (16)	2	Diabetes mellitus
88	w	19	1:128	1:32(16)	2	Parainf. Prozeß
89	w	48	1:128	1:32	2	Rheumatoid
90	w	24	1:256	1:32(64)	3 (2)	Tbc, Virusinfekt.

C) ERGEBNISSE

I. Quantitative Bestimmung der Human-Isohämagglutinine

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Art der verwendeten Seren und Ergebnisse der quantitativen Hämagglutinin-Bestimmung im Reihenverdünnungstest. Von je 30 Seren der Blutgruppen A, B und C (insgesamt 90) mit gleicher Verteilung beider Geschlechter im Alter von 1 bis 76 Jahren sind Verdachts- und gesicherte klinische Diagnosen, sowie Ergebnisse der serologischen Untersuchungen aufgeführt. Der Gesamtiisohämagglutinin-Gehalt der bei 56° C Komplement-inaktivierten Seren ist dem reduzierten Hämagglutinin-Titer nach Erhitzen auf 65° C gegenübergestellt. Bei dieser Temperatur wird nach JOHNSON und HOLBOROW (1961), SCHIERZ (1967) die IgM-Fraktion des Serums unwirksam gemacht und damit die Aktivität einer der 3 Gamma-Globulin-Klassen IgA, IgG und IgM der Isohämagglutinine aufgehoben. Der Gesamt-titer, der zwischen 1:8 und 1:512 schwankt, fällt bei allen Seren mit wenigen Ausnahmen deutlich um 1-4 Titerstufen ab. In der BG C mit den Agglutininen Anti-A und Anti-B liegen die Endtiter in der Regel im gleichen Bereich.

1) Gesamtisoagglutinine

Die Häufigkeitsverteilung der Endtiter in den drei Blutgruppen sind in Tabelle 2 gegenübergestellt. Für die reziproken Werte der Verdünnungsreihe wurde nach FREGLER, CHEIKH-ALI(1967) der Logarithmus zur Basis 2 eingesetzt (z.B. für 1:64: $\log_2 64 = 5$) und damit die geometrische Reihe in linearer Form ausgedrückt. Die Häufigkeiten der Endtiter zeigen bei den 3 Blutgruppen unterschiedliche Werte. Für Anti-A (Blutgruppe B) fehlen Werte von 1:8 und 1:16, ein Titer von 1:32 tritt 8mal auf, häufigster Wert (Modal-

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung der Agglutinin-Endtiter bei den Blutgruppen A, B und O. Logarithmische Angabe der Verdünnungsstufen

Endtiter der Gesamttagglutinine	$2_{\log}$	B		A		O	
		Anti A	Anti B	Anti A	Anti B	Anti A	Anti B
1 : 8	3	-	6	1	2		
1 : 16	4	-	7	1	6		
1 : 32	5	8	8	5	8		
1 : 64	6	10	5	12	7		
1 : 128	7	9	4	7	5		
1 : 256	8	2	-	4	2		
1 : 512	9	1	-	-	-		
Gesamtzahl		30	30	30	30		

wert) ist 1:64 mit 10, ein Serum (das einzige der gesamten Untersuchung) erreicht den Titerwert 1:512. Anti-B (BG A) weist bereits beim Endtiter 1:8 6 Seren auf, der Modalwert mit 8 Häufigkeiten liegt bei 1:32, 4 Seren erreichen 1:128. Die Häufigkeiten der Blutgruppe O verteilen sich zwischen 1:8 (Anti-A 1, Anti B 2 Seren) und 1:256 (Anti-A 4, Anti-B 2 Seren), die häufigsten Werte liegen für Anti-A bei 1:64, für Anti-B bei 1:32.

In Abbildung 1 - 4 sind jeweils 2 Agglutiningruppen in ihrer Häufigkeitsverteilung als Kurven gegenübergestellt.

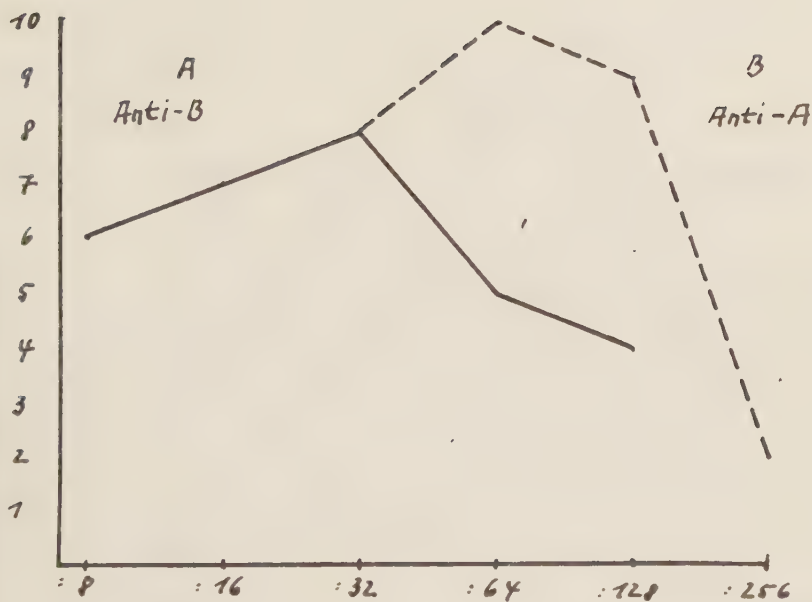


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung der Agglutinin-Endtiter bei den Blutgruppen A (Anti-B) und B (Anti-A).
Abszisse: Endtiter, Ordinate: Anzahl der Seren

Auf Abb. 1 erscheinen beim Vergleich der Blutgruppen A und B die Frequenzen der Anti-B-Kurven gegenüber Anti-A deutlich nach kleineren Titerwerten hin verschoben. Der Kurvenverlauf von Anti-B ist flach, beginnt und endet bei relativ hohen Frequenzen, aufsteigender und absteigender Schenkel haben nahezu die gleiche Neigung. Die Kurve der Anti-A-Agglutinine beginnt bei 1:32 mit der Häufigkeit 8, der aufsteigende Schenkel ist damit verkürzt, zwischen 1:128 und 1:256 fällt sie steil ab.

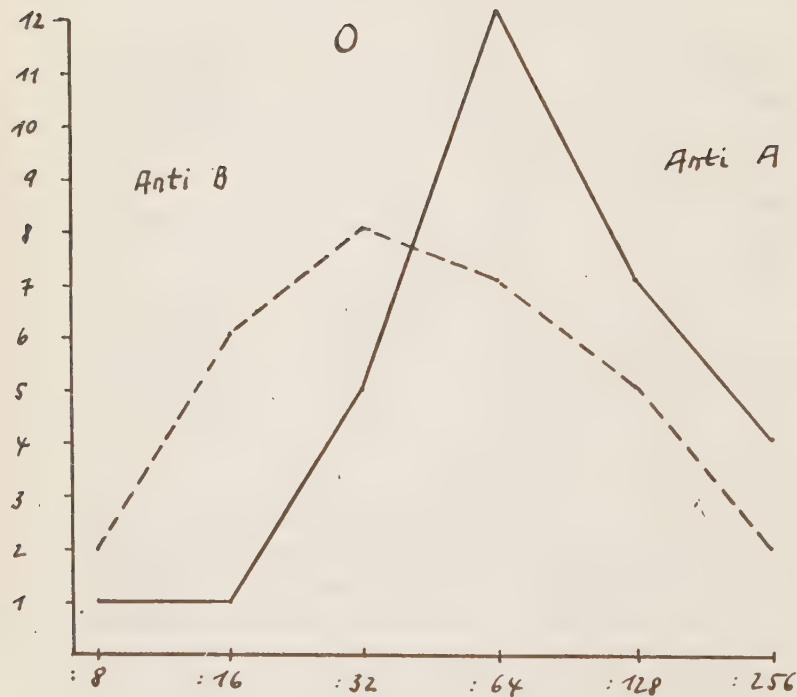


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Agglutinin-Endtiter von Anti-A und Anti-B der Blutgruppe O.
Abszisse: Endtiter, Ordinate: Anzahl der Seren

Anti-A und Anti-B der Blutgruppe O (Abb. 2) zeigen ähnliche Verteilungskurven. Die Kurve für Anti-B ist ebenfalls in Richtung kleinerer Werte versetzt, das Maximum ist gleichfalls tiefer als bei Anti-A. Beide Kurven steigen steiler an als sie abfallen, besonders Anti-A, das von allen Verteilungskurven den größten Anstiegswinkel und den höchsten Modalwert aufweist.

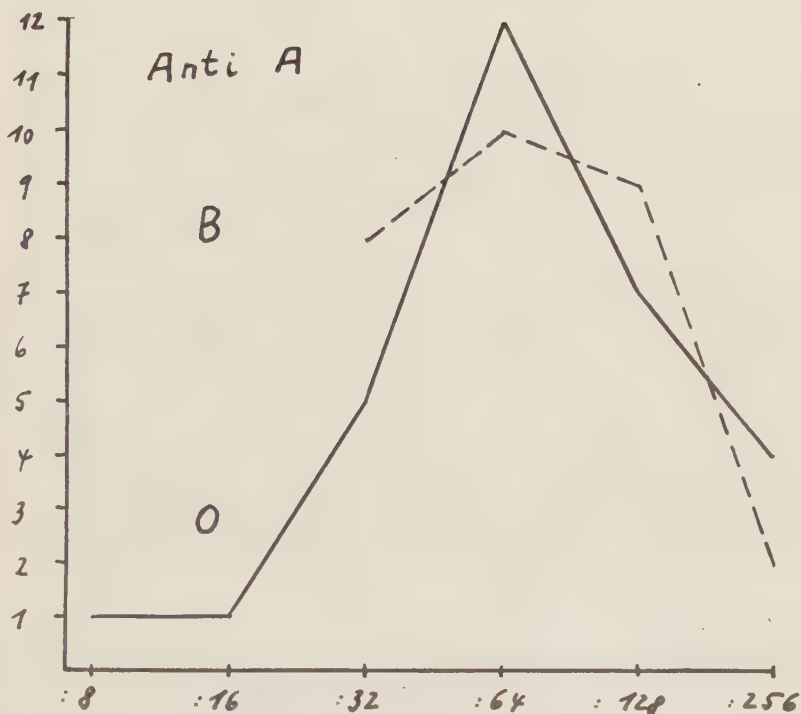


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der Agglutinin-Endtiter von Anti-A bei den Blutgruppen B und O

Der Vergleich des gleichartigen Agglutinins Anti-A der Blutgruppen B und O (Abb. 3) zeigt, daß sich beide Verteilungskurven auf den gleichen Titerbereich von 1:32 bis 1:256 erstrecken. Die maximale Häufigkeit liegt für beide Verteilungen bei 1:64.

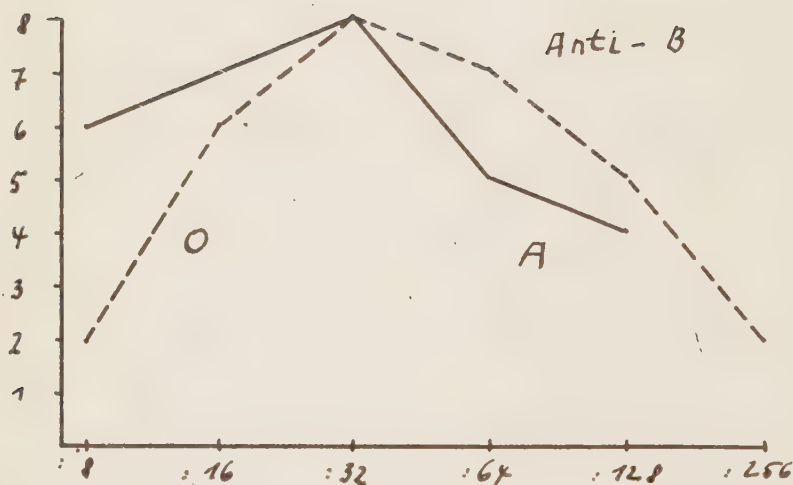


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der Agglutinin-Endtiter von Anti-B bei den Blutgruppen A und O

Abbildung 4 stellt die Gruppen A und O gegenüber. Die Kurven decken sich nahezu, der Modalwert bei 1:32 (eine Titerstufe niedriger als beim Anti-A-Vergleich) ist bei beiden gleich stark vertreten. Die Kurve von BG A ist flach, während die Verteilung von BG O der glockenförmigen Normalverteilung von allen Kurven am meisten entspricht.

Die Diagramme der Häufigkeiten der Gesamttagglutinin-Titer bieten Anhaltspunkte für folgende Feststellungen:

1. Anti-A liegt im Durchschnitt in höherer Konzentration vor als Anti-B, sowohl in BG B als auch in BG O.
2. Anti-A ist in den Seren der BG O und B etwa gleich stark vertreten, ebenso Anti-B in den Gruppen A und O.
3. Die Häufigkeiten von Anti-A gruppieren sich stärker um den Mittelwert, streuen nicht so stark wie die von Anti-B (BG A, O).

Diese Aussagen sind jedoch unsicher und hypothetischer Art, solange keine objektive Größe zum Vergleich verwendet wird und die Kurven nicht auf ihre Vergleichbarkeit hin geprüft sind. Auf statistischem Weg kann der Nachweis gebracht werden, daß die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Gruppe der theoretischen Verteilung des Untersuchungsmaterials (der Normalverteilung) entspricht und daß die einzelnen Verteilungskurven gleiche Varianzen haben und damit vergleichbar sind. Als Vergleichsgröße kann unter diesen Voraussetzungen der Mittelwert verwendet werden.

Tabelle 3: Mittel- und Streuungswerte der Verteilungskurven, Grad der Anpassung der gefundenen an die Normalverteilung

Blut- gruppe	arith- meti- sches Mittel $\bar{x}$	Varianz s^2	Stan- dard- ab- wei- chung s	Vergleich mit einer Normalverteilung		
				χ^2	Über- schrei- tungs- wahr- schein- lichkeit	Anpas- sung an theoret. Verteil- ung
B Anti A	6,3	1,10	1,05	0,452 (F=1)	50%	"gut"
A Anti B	4,8	1,75	1,32	1,00 (F=2)	62%	"gut"
O Anti A	6,1	1,39	1,17	2,40 (F=2)	30%	"mäßig"
O Anti B	5,4	1,84	1,36	0,50 (F=2)	78%	"gut"

Tabelle 3 enthält die errechneten arithmetischen Mittelwerte, Varianzwerte und die Größe der Standardabweichung der 4 Verteilungen. Außerdem sind die Ergebnisse des Vergleichs der empirischen mit der theoretischen Verteilung (χ^2 -Test) aufgeführt. Der Wert χ^2 ergibt sich aus dem Vergleich der berechneten erwarteten Häufigkeiten einer Normalverteilung mit den Häufigkeiten der Stichprobe. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit bestimmt in Prozenten die Wahrscheinlichkeit, mit der unter Voraussetzung einer normalen Verteilung der Variablen in der Grundgesamtheit χ^2 für die Stichprobe auftritt. Diese Prozentwerte sind ein Maß für die Anpassung der empirischen an eine theoretische Verteilung, die nach CLAUS und EBNER (1967) mit den Prädikaten "gut, mäßig, schwach" charakterisiert sind. Blutgruppe B (Anti-A) liegt mit 50% Überschreitungswahrscheinlichkeit an der unteren Grenze einer "guten Anpassung" an die Normalverteilung. Blutgruppe A (Anti-B) mit 62% und O (Anti-B) mit 78% sind "gut angepaßt", während BG O (Anti-A) mit 30% nur "mäßige Anpassung" zeigt. Mit diesen Ergebnissen stehen die genannten Charakteristika der Diagramme in Einklang. Zur Prüfung des Verhältnisses der Varianzen (Tab. 4) wurden jeweils zwei Verteilungen verglichen und festgestellt, ob ein Unterschied als zufällig oder signifikant angesehen werden kann. Die Werte in Tab. 4 zeigen, daß in allen 4 Gruppen F über dem Quotienten aus s_1^2 und s_2^2 liegt und damit mit 5%iger Irrtumswahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied der Streuungen der 4 Agglutinin-Gruppen ausgeschlossen werden kann. Somit wird die Hypothese 3, nach der Anti-A und Anti-B einen Unterschied hinsichtlich der Streuung aufweisen sollten, zurückgewiesen. Mit einer gewissen Einschränkung für die Verteilung von Anti-A (BG O), die nur mäßig an eine Normalverteilung angepaßt ist, ist die Annahme gerechtfertigt, daß die 4 Verteilungen für einen Mittelwertvergleich dieselben Voraussetzungen besitzen.

Tabelle 4: Prüfung der Kurven auf gleiche Varianz (O-Hypothese); Bestimmung signifikanter Mittelwertunterschiede

Blut- gruppe	Varianzvergleich			Mittelwertvergleich		
	$\frac{s_1^2}{s_2^2}$	F_{α} 29/29	Irrtums- wahrschein- lichkeit bei O-Hypo- these	t-Wert	$t_{\alpha, 58}$	Signifi- kanz eines Mittelwert- unterschie- des
B - O Anti A	1,26	1,85	5%	0,70	2,00 (t 0,05)	keine
A - O Anti B	1,05	1,85	5%	1,76	2,00 (t 0,05)	keine
A - B Anti A Anti B	1,59	1,85	5%	4,78	3,46 (t 0,001)	vorhanden
O Anti A Anti B	1,32	1,85	5%	2,13	2,00 (t 0,05)	vorhanden

Mit 6,3 weist Anti-A (BG B) den höchsten Mittelwert auf (Tab. 3). Er liegt zwischen den Titerstufen 1:64 und 1:128. Im gleichen Bereich befindet sich der etwas niedrigere Mittelwert für Anti-A (BG O) mit 6,1. Für Blutgruppe A (Anti-B) mit 4,8 liegt das arithmetische Mittel unterhalb der Titerstufe 1:32, für BG C (Anti-B) mit 5,4 zwischen 1:32 und 1:64. Aus Mittelwertdifferenzen können ohne weiteres keine Schlüsse gezogen werden, da es sich um zufällige Abweichungen der gleichen Grundgesamtheit handeln kann. Auf statistischem Wege (t-Test) kann diese Möglichkeit (O-Hypothese) gegebenenfalls als unrichtig zurückgewiesen und damit die Signifikanz des Mittelwertunterschiedes nachgewiesen werden. Tab. 4 enthält die Ergebnisse der Mittelwert-Prüfung. Die Mittelwerte der Anti-A-Verteilung der BG B und O weisen keinen signifikanten Unterschied auf, da der Wert 0,70 unter der kritischen Größe von 2,0 (5% Fehlerwahrscheinlichkeit) liegt. Dagegen wurde für BG A (Anti B) und BG B (Anti A) ein Mittelwertunterschied gesichert (Signifikanz

1% , der t-Wert 4,78 liegt über dem 1%-Wert von 3,45), ebenso für BG O (Anti-A, Anti-B) mit der Signifikanz 5%. Danach erweist sich die Annahme als sehr wahrscheinlich, daß Anti-A in den Blutgruppen B und O in höherer Konzentration vorliegt als Anti-B in den Blutgruppen A und O, eine gemeinsame Grundgesamtheit also nicht angenommen werden darf. Mit gleicher Sicherheit darf geschlossen werden, daß die gleichnamigen Agglutinine derselben Grundgesamtheit angehören und sich nicht quantitativ unterscheiden.

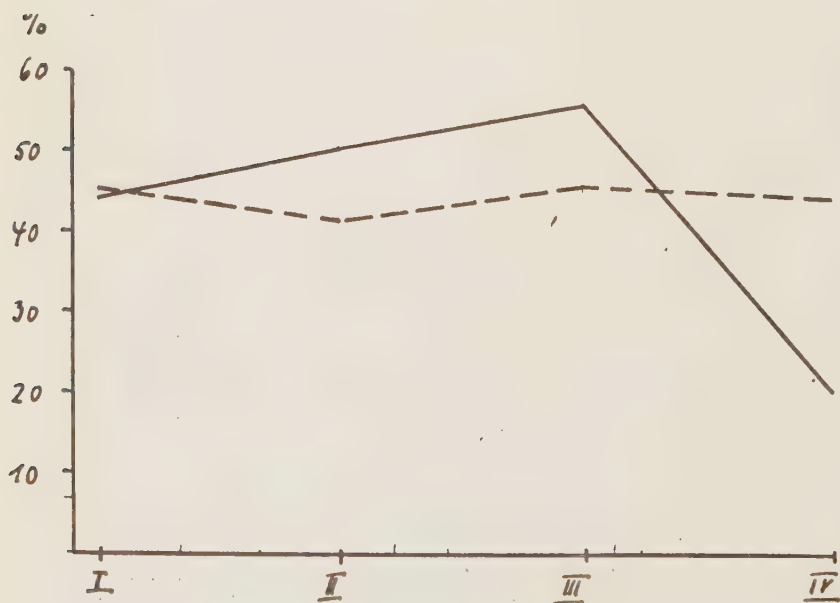


Abb. 5: Altersabhängigkeit der Agglutinin-Titer von Anti-A (durchgezogene Linie) und Anti-B (gestrichelte Linie). Prozentwerte der Häufigkeit (Ordinate) von Individuen mit Endtitern von 1:128 und darüber bei Anti-A (BG B und O) und von 1:64 und darüber bei Anti-B (BG A und O) in 4 Altersgruppen (Abszisse): Gruppe I: 15-30 Jahre Gruppe III: 46-60 Jahre Gruppe II: 31-45 Jahre Gruppe IV: über 61 Jahre

Zur Beurteilung der Altersabhängigkeit der Isoagglutinin-Titer wurden 4 Alters-Gruppen gebildet und festgestellt, wie hoch in jeder Gruppe der prozentuale Anteil der Individuen mit einem Titer von 1:128 und darüber (bei Anti-A) und von 1:64 und darüber (bei Anti-B) ist (Abb. 5).

15 - 30 Jahre:	Anti-A 44% (von 18),	Anti-B 46% (von 13)
31 - 45 Jahre:	" 50% (von 14),	" 41% (von 17)
46 - 60 Jahre:	" 55% (von 11),	" 45% (von 11)
61 - 76 Jahre:	" 20% (von 7),	" 43% (von 7)

Die Anzahl der Individuen in jeder Gruppe ist nicht ausreichend groß (besonders in der letzten Gruppe), so daß der Wert dieser Untersuchung begrenzt ist.

2) Hämagglutinin-Titer nach Verlust des IgM-Anteils

Der Anteil des Immunglobulins IgM an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität wurde aus dem Titerabfall nach Erhitzen des Serums auf 65° C bestimmt. Bei dieser Temperatur werden die Globuline, die zum Makroglobulin-Typ gehören, inaktiviert. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß nach Erhitzen die Endtiter auf ein 1-4 Stufen tieferes Niveau absinken. Bei 5 der 90 Seren trat keine Veränderung auf. Ein Abfall um 2 Titer-schritte wird am häufigsten beobachtet (Modalwert). Tabelle 5 gibt Aufschluß über die Häufigkeits-Verteilung des Titerabfalls in Stufen (Differenz der logarithmischen Werte) bei den 3 Blutgruppen, Abb. 6 stellt die Verteilungen grafisch gegenüber. Jede Agglutinin-Gruppe weist ein Serum (BG O Anti-A zwei Seren) ohne Titerabfall auf und je ein Serum (BG O Anti-B drei Seren) mit einem Verlust von 4 Titterschritten. Die überwiegende Zahl der Seren liegt im Bereich von 1-3 Titerstufen. In allen 4 Gruppen ist der Wert 2 (2 Verdünnungsschritte) am häufigsten mit folgenden Frequenzen und %-Werten: BG B 17 (56,61%), BG A 19

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung des Titerabfalls in Verdünnungsstufen nach Verlust der IgM-Aktivität in den 3 Blutgruppen A, B und O. Neben den absoluten Werten die Prozentwerte

Titer- abfall in Stufen	B		A		O		A	
	Anti A		Anti B		Anti A		Anti B	
	%		%		%		%	
0	1	3,33	1	3,33	2	6,66	1	3,33 55
1	4	13,32	7	23,31	11	36,63	7	23,31 29
2	17	56,61	19	63,27	11	36,63	13	43,29 60
3	7	23,31	2	6,66	5	16,65	6	19,98 20
4	1	3,33	1	3,33	1	3,33	3	9,99 6
Gesamtwert	30		30		30		30	120

(63,3%), BG O Anti-A 11 (36,6%), Anti-B 13 (43,3%). Die benachbarten Werte (1 und 3) sind wechselnd häufig und mit Ausnahme von Anti-A (BG O), das mit 11 (36,6%) die gleiche Frequenz wie der Modalwert aufweist, in weit niedrigerer Zahl vertreten (2-7 bzw. 6,6% - 23,3%). Der Kurvenvergleich Abb. 5 verdeutlicht die Anhäufung der Frequenzen bei allen 4 Gruppen auf den Bereich von 1 bis 3 Titerstufen, so daß der Eindruck schmalgipfliger Normalverteilungskurven entsteht. Die Verteilungen der Blutgruppe O erscheinen stärker gestreut auf Kosten der kurvenhöhe als die der Gruppen A und B. Der Vergleich der 4 Diagramme erlaubt folgenden hypothetischen Schluß: In den drei Blutgruppen zeigen die Intervalle des Titerverlustes ähnliche Verteilungen um eng benachbarte Mittelwerte, stammen demnach aus der gleichen Grundgesamtheit (O-Hypothese). Zur Sicherung dieser Annahme wurden arithmetische Mittelwerte und Streuungswerte bestimmt sowie ein Varianzvergleich und Mittelwertvergleich vorgenommen. Die arithmetischen Mittelwerte (Tab. 3) liegen eng benachbart im Bereich von 1,73 (O Anti-A) bis 2,13 (O Anti-B), dazwischen liegen die Werte für A Anti-B: 1,83 und für

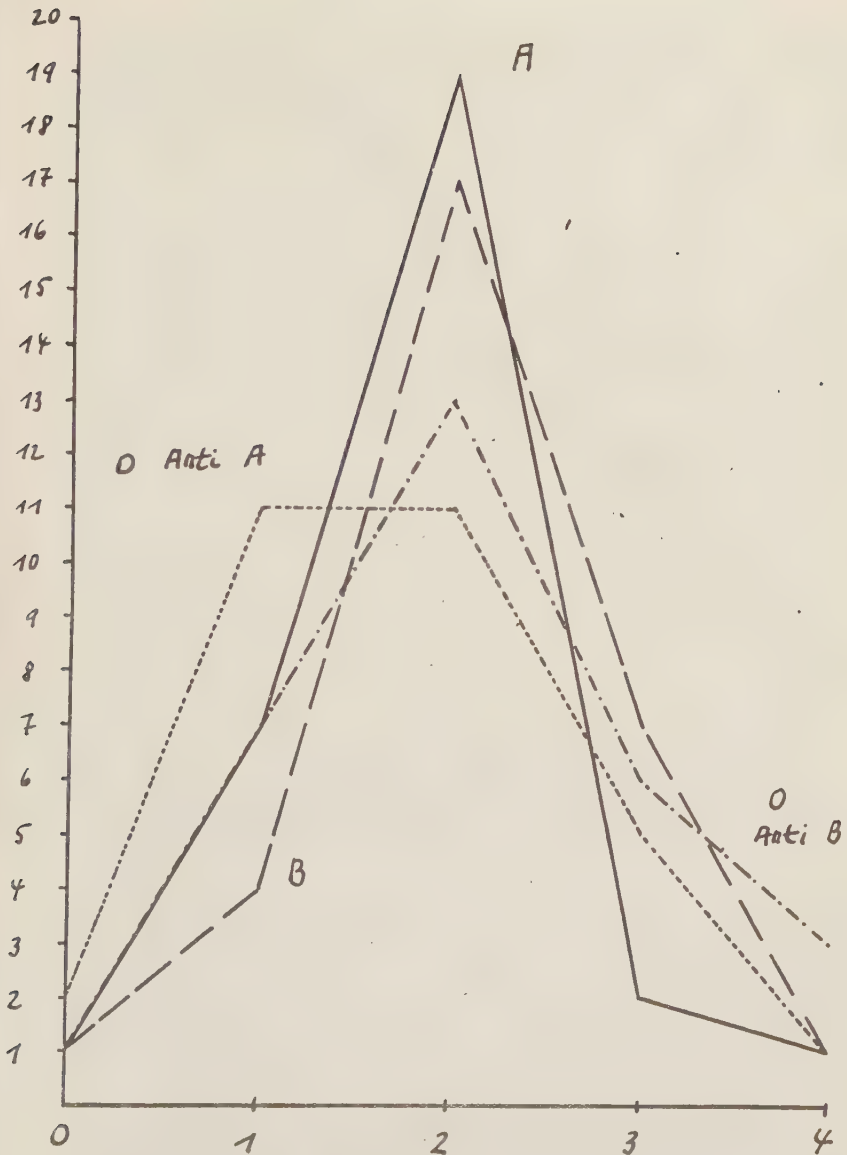


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung des Titerabfalls in Verdünnungsstufen nach Inaktivierung des IgM-Anteils in den drei Blutgruppen A, B und O. Abszisse: Titerstufen, Ordinate: Häufigkeiten

Tabelle 6: Mittel-, Streuungswerte und Variabilitätskoeffizient der Verteilungskurven des Titerabfalles

Blutgruppe	arithmetisches Mittel $\bar{x}$	Varianz s^2	Standardabweichung s	68%-Bereich der Meßwerte $\bar{x} \pm s$	Variationskoeffizient v
B Anti A	2,10	0,644	0,80	1,3 - 2,9	38,2
A Anti B	1,83	0,558	0,75	1,1 - 2,6	40,9
O Anti A	1,73	0,892	0,94	0,8 - 2,7	54,3
O Anti B	2,13	0,991	1,00	1,1 - 3,1	46,9

Tabelle 7: Varianzvergleich, Mittelwertvergleich (t-Test)

Blutgruppe	B - O Anti A	A - O Anti B	A - B Anti B-A	O Anti A-B
F-Wert (F = 1,85)	1,38	1,78	1,15	1,11
t-Wert (t 5%/60= 2,00)	1,63	1,32	1,35	1,59

B-Anti-A: 2,10. Die Standardabweichungen weisen Größen von 0,75 (Anti-B, BG A) bis 1,00 (Anti-B, BG O) auf und bestimmen damit einen Bereich von 0,8 bis 3,1 Titerstufen, in dem die 68%-Frequenzen aller 4 Gruppen enthalten sind. An der unteren Grenze des Bereichs liegt BG O (68% der Häufigkeiten zwischen 0,8 und 2,7), es folgen BG A Anti-B (zwischen 1,1 und 2,6) und BG B Anti-A (zwischen 1,3 und 2,7). Im oberen Teil befindet sich O Anti-B (zwischen 1,1 und 3,1).

Zur Bestätigung der O-Hypothese ist der Mittelwertvergleich nötig. Von den beiden Voraussetzungen für den t-Test, gleiche Varianz und Übereinstimmung mit der Normalverteilung, konnte letztere nicht geprüft werden. Die vier

Kurven sind sehr steil und schmalgipflig, dem Aussehen nach entsprechen sie dem Bild von Normalverteilungen. Die Zahl der Titterschritte ist aber zu gering, um den Kurvenverlauf genauer zu markieren und die erwarteten Frequenzen festzustellen. Für den χ^2 -Test fehlt die nötige Zahl der Klassen, um die Freiheitsgrade aufzuwiegen. Der Nachweis für die Übereinstimmung der 4 Kurven mit der Normalverteilung kann demnach nicht erbracht werden. Trotzdem erscheint die Übereinstimmung wahrscheinlich: Die Häufigkeitsverteilungen weisen einmal im Diagramm darauf hin, zum anderen entstammen sie dem gleichen Untersuchungsgut (Isohämagglutinine), für das bereits der Nachweis der Anpassung an die Normalverteilung erbracht wurde. Dennoch sind die Ergebnisse dieser Mittelwertvergleiche hinsichtlich ihrer Allgemeingültigkeit nur unter Vorbehalt anzuerkennen. Tab. 7 zeigt, daß im Varianzvergleich keine Unterschiede bestehen. Alle F-Werte liegen unter der Größe der Irrtumswahrscheinlichkeit 5% (1,85) und erfüllen damit die O-Hypothese. Im Mittelwertvergleich (Tab. 7) ergeben sich für alle Gruppierungen Werte, die unter der kritischen Größe der 5%-Fehlerwahrscheinlichkeit liegen. Mit der genannten Einschränkung kann angenommen werden, daß die 4 Gruppen einer Grundgesamtheit angehören und gleiche Verteilung beim Titerverlust durch IgM-Inaktivierung aufweisen.

Eine Unterschiedliche Verteilung des Titerabfalls ist aber nicht nur zwischen den Blutgruppen untereinander, sondern auch innerhalb einer Gruppe denkbar. Die Annahme liegt nahe, daß eine Abhängigkeit des Titerabfalls von der Höhe des Ausgangstiters besteht, daß etwa von einem hohen Niveau ein stärkerer Abfall erfolgt als von einem niedrigen. Abb. 7 und 8 stellen nach Blutgruppen getrennt für jedes Serum die Endtiter vor und nach IgM-Verlust dar. Die Seren sind nach steigendem Gesamtiter (Ordinate) geordnet und die Größen

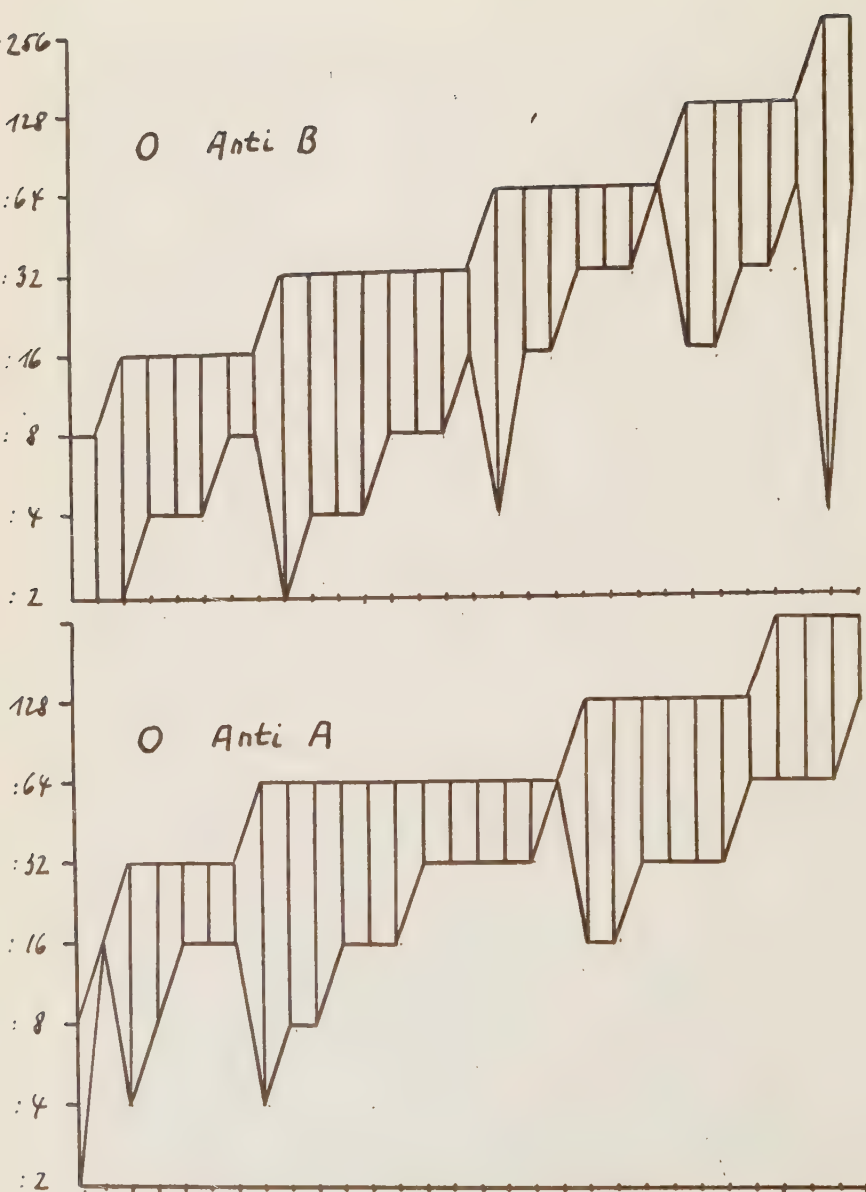


Abb. 7: Darstellung des IgM-Anteils (senkrechte Linien) bei 30 Seren der BG O. Obere Begrenzung: Gesamt-titer, untere Begrenzung: Endtiter nach IgM-Inaktivierung. Abszisse: Serum Nr. 1-30, Ordinate: Endtiter

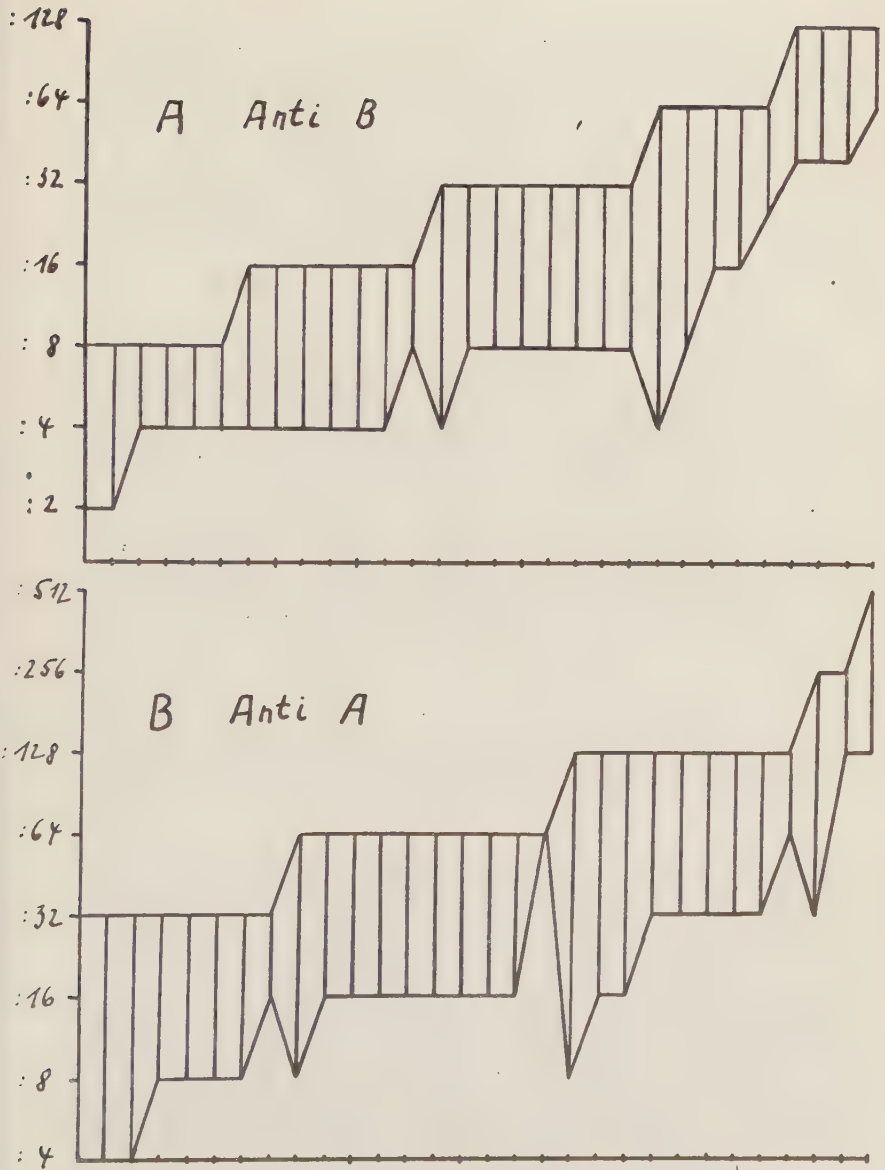


Abb. 8: Darstellung des IgM-Anteils (senkrechte Linien) bei 30 Seren der BG A (oben Serum Nr. 31-60) und 30 Seren der BG B (unten Serum Nr. 61-90). Obere Begrenzung: Gesamttiter, untere Begrenzung: Endtiter nach IgM-Inaktivierung

der ersten und zweiten Bestimmung mit einer Geraden verbunden. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, daß beide Kurven parallel zueinander ansteigen und von 1:32 an auf jedem Niveau der Titer um 1-3 Stufen absinken kann. Von 1:8 und 1:16 aus fällt er nur um 1-2 Schritte. Die größeren Schwankungen in BG O entsprechen dem etwas häufigeren Vorkommen von Titerverlusten um 1 und 3 Stufen (Tab. 5), die auch in den leicht erhöhten Standardabweichungen (Tab. 6) zum Ausdruck kommen.

Einzelne Seren zeigen atypische Verhältnisse: Ein Titer-Abfall um 4 und mehr Stufen tritt bei 4 Seren der BG O auf (Nr. 13, 21, 25, 27) sowie bei Serum Nr. 55 der BG A und Serum Nr. 85 der BG B. Keine Titerveränderung nach Hitzeeinwirkung wurde bei 5 Seren beobachtet: Nr. 5 und 10 (BG O), Nr. 68 (BG B) und Nr. 56 (BG A). Insgesamt kann festgestellt werden, daß der IgM-Anteil an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität unabhängig von der Ausgangs-Titerhöhe ist.

II. Untersuchungen zur Differenzierung der drei Gamma-Globulin-Klassen der Isohämagglutinine

Während im ersten Teil der Untersuchungen die Frage der Anteile von IgA und IgG einerseits und IgM andererseits an der Gesamttagglutininaktivität sowie deren Verteilung in den Blutgruppen A, B und O im Vordergrund standen, sollten im zweiten Teil die drei Gamma-Globulin-Komponenten der Isoagglutinine quantitativ exakt bestimmt werden. Dazu war es notwendig, ein Verfahren zur Isolierung der Isoagglutinine zu entwickeln, das die Reindarstellung der Agglutinine aus Serum erlaubte. Weiterhin mußte eine Methode zur Differenzierung und quantitativen Bestimmung der drei Immunglobulinklassen der Hämagglutinine gefunden werden.

Tabelle 8: Isohämagglutinititer und Serumprotein-Klassen in 5 präparativ getrennten Fraktionen bei 3 Seren der Blutgruppen A, B und O

Fraktion	1	2	3	4	5
Anti B Blutgruppe A	1 : 2 (4) IgM (schwach) IgA o. IgG Transferrin	1 : 4 IgA o. IgG Transferrin	1 : 8 (16) IgG Doppellinie	1 : 4 IgG Hauptmenge	(1 : 2) IgG schwach
Anti A Blutgruppe B	1 : 2 (4) IgM ? IgA o. IgG Transferrin	1 : 4 IgA o. IgG Transferrin	1 : 8 (4) IgG Doppellinie	(1 : 2) IgG Doppellinie	- IgG Einzellinie
Anti A Anti B Blutgruppe O	1 : 4 1 : 2 IgM IgA o. IgG Transferrin	1 : 8 1 : 4 IgG Transferrin	1 : 8 1 : 4 IgG verschieden schnell	1 : 8 1 : 4 (2) IgG Hauptmenge	1 : 2 1 : 2 IgG Einzellinie

I

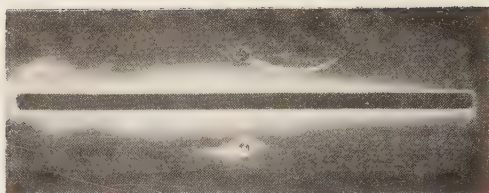
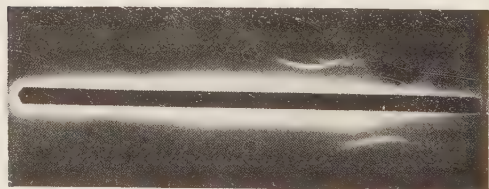


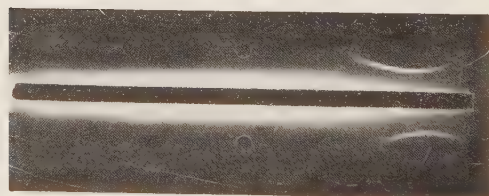
Abb. 9

II



III

IV



V

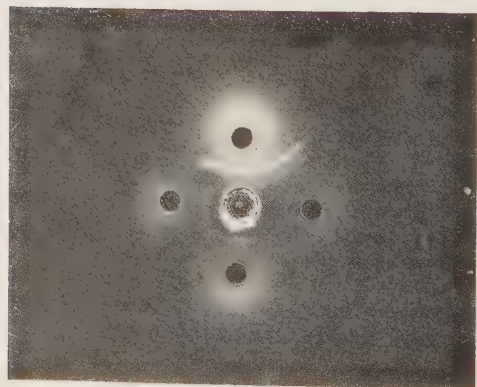


Abb. 10

Abb. 9: Immunelektrophoretisches Bild von 5 elektrophoretisch präparierten Fraktionen (I-V) eines Serums der Blutgruppe C, entwickelt mit Anti-Human-Serum vom Pferd (Serum 223)

Abb. 10: Nachweis wärmedissoziierter Proteine vom Stroma (Mitte) im AGD-Test mit den monospezifischen Anti- γ A (rechts), Anti- γ M (unten), Anti- γ G (links) und Anti-Human-Serum vom Pferd (oben)

1. Isoagglutinin-Aktivität in verschiedenen elektrophoretisch getrennten Gamma-Globulin-Fraktionen

Mit der Technik der präparativen Elektrophorese wurden drei Seren mit relativ hohem Isohämagglutinintiter (BG A 1:128, BG B 1:128, BG O Anti-A 1:64, Anti-B 1:64) in je 5 Fraktionen (Fr.) aufgetrennt. Von jeder Fraktion wurden die Gamma-Globulin-Komponenten mittels Immunelektrophorese sowie der Agglutinintiter bestimmt. In der Abbildung 9 ist das immunelektrophoretische Bild der Fraktionen I (nah am Reservoir, schnelle Proteine) bis 5 (fern vom Reservoir, langsame Proteine) für das Serum der BG A, Anti-B wiedergegeben. Außer den Gamma-Globulinen und Transferrin erscheint kein weiteres Protein. IgM stellt sich bei allen drei Blutgruppen nur in Fr. 1 in einer schwachen Linie dar. IgA ist von IgG in Fr. 1 und 2 nicht zu unterscheiden (Antiserum war das polyvalente Anti-Human-Serum 223). Von IgG, das quantitativ am stärksten vorhanden ist, findet sich die Hauptmenge in Fr. 4; in Fr. 3 stellt es sich bei allen drei Blutgruppen in einer Doppellinie dar. Eine Gegenüberstellung der Gamma-Globulin-Komponenten und Isohämagglutinintiter der einzelnen Fraktionen in Tab. 8 soll zeigen, in welchen Gamma-Globulin-Klassen die für den jeweiligen Titer verantwortlichen Isoagglutinine enthalten sind. Danach findet sich Agglutinin-Aktivität in allen 5 Fraktionen, in der Fraktion 5 allerdings

nur in geringem Umfang und nicht regelmäßig (für BG B, Anti-A fehlte sie ganz). Der Maximaltiterwert von 1:8 liegt für die BG A und B in der 3. Fraktion, für BG O in der 2. bis 4. Fraktion. Für den niedrigen Titer von 1:2 (BG O Anti-A 1:4) in der ersten Fraktion sind die immunoelektrophoretisch schwach in Erscheinung tretenden Gamma-Globuline IgM und IgA bzw. IgG (eine Linie) verantwortlich. Der Titer 1:4 (BG O Anti-A 1:8) in der 2. Fraktion ist einmal den dargestellten Fraktionen IgG bzw. IgA zuzuschreiben. Außerdem wird auch ein Rest der IgM-Fraktion beteiligt sein, die in der 2. Fraktion zu erwarten ist, obgleich IgM (zu geringe Konzentration) nicht dargestellt ist. Die Fraktionen 3 bis 5 enthalten ausschließlich IgG. Die stärkste Agglutininaktivität findet sich in Fr. 3, bei BG O außerdem auch in Fr. 2 und 4. Fr. 4 und 5 zeigen einen Abfall des Titers, obgleich im elektrophoretischen Bild in diesen Fraktionen die Hauptmenge von IgG erscheint. Die Untersuchungen geben Anhaltspunkte für folgende Feststellungen: 1. In Fraktion 1 und 2 wurde die Isoagglutininaktivität von IgA und IgM nachgewiesen, in Fraktion 3 bis 5 die von IgG. Damit ist eine Möglichkeit zur Differenzierung dieser beiden Gruppen gegeben. 2. Das Maximum der Agglutininaktivität in Fraktion 3 ist dem Gamma-Globulin IgG zuzuschreiben. Es liegt im Bereich des rasch wandernden IgG, während die Hauptmenge von IgG mit den Immunantikörpern im langsam wandernden Teil lokalisiert ist.

2. Versuche zur Isohämagglutinin-Darstellung mit AB-Substanzen

a) Untersuchungen mit käuflichen AB-Substanzen

Die beiden AB-Substanzen "Neutr. AB" und "blood group specific substances A and B (N.F.)" wurden im OUCHTERLONY-Test

in Verdünnungen von 1:1 bis 1:4 mit Anti-A und Anti-B-Testseren geprüft. Es stellten sich keine Präzipitate dar. Daraufhin wurde der gleiche Versuch in einem PVP-Agar wiederholt mit dem Ziel, größere Molekülkomplexe herzustellen, die als Präzipitate sichtbar werden. Auch in dieser Modifikation stellten sich keine Linien dar.

In den folgenden Experimenten wurde der Versuch unternommen, mit AB-Substanzen Isohämagglutinine aus Serum zu absorbieren. In einem Vorversuch wurde zu 1 ml Serum tropfenweise AB-Substanz zugegeben, zur Feststellung einer sichtbaren Präzipitation. In Verdünnungen von 1:1 bis 1:26 trat keine sichtbare Präzipitation auf. Daraufhin wurden 10 ml Serum der BG O mit 1,5 ml Neutr. AB absorbiert, abzentrifugiert und ein spurenhafte Sediment 3mal ausgewaschen. Zur Trennung etwaiger Isoagglutinine von der AB-Substanz wurde der Weg des Antigen-Überschusses gegangen. Zugaben von 0,2 ml NaCl-Lösung und weniger Tropfen AB-Substanz führten zu keiner Auflösung des vermeintlichen Präzipitates. Nach Zentrifugation und Testung des Überstandes in der AGD und Immunelektrophorese, die keinerlei Protein erbrachten, durfte angenommen werden, daß eine Präzipitation mit AB-Substanz nicht erfolgte und der Niederschlag auf Spuren ausgefällten Fibrins beruhte. Es kann somit festgestellt werden, daß die beiden AB-Substanzen nicht geeignet sind, Isohämagglutinine in der AGD zu präzipitieren oder aus Humanserum durch Präzipitation zu isolieren.

b) Disaggregiertes Erythrozytenstroma als AB-Substanz

Auf der Suche nach einer präzipitierenden AB-Substanz zur Isolierung der Isoagglutinine wurde ein Verfahren von F.A. GREEN (1967) zur "Disaggregation von Erythrozyten-

membranen" mit Duodecylsulfat-Na-Salz erprobt. Erythrozyten-Stroma wurde mit 2%iger SDS-Lösung in Veronalpuffer PH 7,6 für verschiedene Zeiten inkubiert. Im CUCHTER-LONY-Test wurde das Material gegen entsprechende Testseren (Anti-A bzw. Anti-B) untersucht. Im SDS-Agar stellten sich keine Linien dar, ebenfalls nicht im Agarose-Agar. Dagegen bildeten sich im üblichen 1%igen Agar deutliche, scharf begrenzte Linien zwischen den Reservoiren aus. Um das Stromareservoir herum entstand ein deutlicher Hof. Während des Auswaschens der Objektträger in physiologischer NaCl-Lösung schwanden die Linien langsam. Nach 2 Tagen war keine Spur mehr davon zu erkennen. Zur Deutung dieses Phänomens lassen sich verschiedene Ursachen anführen (Diskussion). Solange der Charakter eines Antigen-Antikörperkomplexes für die dargestellten Linien in Zweifel gezogen werden muß, kann mit SDS disaggregiertes Erythrozyten-Stroma nicht als präzipitierende AB-Substanz verwendet werden.

3. Präparative Darstellung der Isohämagglutinine mit Erythrozyten-Stroma

a) Nachweis dissoziierter Proteine im Agar (Grundversuch)

Zur Trennung und Charakterisierung der an Stroma absorbier-ten Isoantikörper wurde zunächst der Versuch unternommen, eine Elektrophorese unter einer Temperatur von 50° C durchzuführen und die abgelösten elektrophoretisch aufgetrennten Proteinkomponenten mit Antiseren nachzuweisen. Unter denselben Bedingungen wurde zum Vergleich das Ausgangsserum untersucht. Vom Stromakomplex stammende Proteine stellten sich nicht dar, einzelne Linien der Eiweißkomponenten des Ausgangsserums sind erkennbar. Der Agar wird unter der genannten Behandlung stark geschädigt, er zeigt Einrisse

und wirft sich. Außerdem ließ er sich nicht ganz proteinfrei waschen. Da sich dieses Verfahren als ungeeignet erwies, wurde eine Technik erprobt, die Wärmetrennung (im Brutschrank) und Nachweis der abgelösten Antikörper (in AGD nach OUCHTERLONY) zeitlich aufeinander folgen ließ. Dabei zeigt sich, daß im Agar-Gel vom Stroma-Adsorbat wärmedissoziierte Proteine mit Anti-Human-Serum (223) präzipitieren. Eine scharf begrenzte dichte Linie stellt sich in der Mitte des Abstandes der beiden Reservoirs dar, und zwischen dieser und dem Stromareservoir findet sich andeutungsweise ein weiteres sehr schwaches Band. Damit ist ein Hinweis dafür gegeben, daß das dissoziierte Protein immunologisch nicht einheitlich ist. Mit spezifischen Immunsereen lassen sich dann vom gleichen Protein verschiedene Einzelkomponenten differenzieren (Abb. 1C, S. 40). Mit Anti- γ A-Serum (rechts) ist eine äußerst dünne Linie angedeutet, gut begrenzt ist die Linie mit Anti- γ M-Serum (unten), während mit Anti- γ G Serum (COOMBS-Serum) links ein unscharf abgegrenztes aber dichtes Band auftritt. Das Anti-Human-Serum (223) oben, präzipitiert am stärksten in einem sehr breiten, dichten, scharf begrenzten Band, das in den Bereich von Anti- γ A umbiegt, wo es schmaler wird. Es ist offenkundig, daß dieses Protein nicht einer der drei anderen Linien zugeordnet werden kann. Es muß aber in relativ hoher Konzentration im dissoziierten Protein einerseits und im Anti- γ A-Serum andererseits vorliegen. Die Vermutung, daß es sich dabei um Albumin handelt, konnte in späteren Versuchen bestätigt werden. Die Anwesenheit von Albumin im Anti- γ A-Serum und eines weiteren Proteins, das als schwache Linie im gleichen Bereich auftritt, läßt sich auf die Absorption des spezifischen Serums mit Human-Serum-Proteinen zurückführen.

b) Untersuchung der dissoziierten Proteine

Die Ergebnisse in der Agar-Gel-Diffusion (AGD) zeigen, daß bei einem Adsorptionsversuch auf der Basis einer Isohämagglutinationsreaktion außer den Isoagglutininen noch andere Serum-Proteine von Stroma gebunden werden (z.B. Albumin), die bei der Temperatur von 50°C wärmedissoziiierbar sind. Daraus ergibt sich hinsichtlich der Immunglobuline die Konsequenz, daß die dargestellten Gamma-Globulin-Komponenten nicht ohne weiteres als identisch mit den Isoagglutininen angesehen werden dürfen. Zur Klärung dieser Frage wurde in mehreren Versuchen eine Methode entwickelt, mit der im Agar befindliche Proteine in ausreichender Konzentration rückgewonnen werden konnten, so daß eine Differenzierung der Eiweißanteile sowie eine Prüfung der Isoagglutinin-Aktivität der Gamma-Globuline erfolgen konnte.

Im 1. Versuch wurden 3,5 ml Serum II (O Anti-A 1:128) mit $0,7\text{ cm}^3$ A-Stroma absorbiert. Anschließend zeigte das Serum bei einer Verdünnung von 1:2 keine Agglutination mehr. Eine Platte mit 8 Löchern wurde verwendet und von der Lösung aus dem Agar vor und nach Evaporation eine einfache und eine Immunelektrophorese durchgeführt. In keinem der Tests stellte sich Protein dar. Im 2. Versuch wurden verschiedene methodische Veränderungen getroffen: Ein höheres Serumvolumen (16 ml Serum III, BG A, Anti-B 1:64) wurde mit $2,5\text{ cm}^3$ frischem Stroma im Verhältnis 6:1 absorbiert, die Agarplatte mit 3 Rinnen versehen und die Lösungszeit auf 5 Stunden, die Diffusionszeit auf 10 Stunden festgelegt. Beim Vergleich des Ausgangsserums mit der gewonnenen Proteinlösung war sowohl in der einfachen Elektrophorese als auch in der Immunelektrophorese außer einer Spur Albumin kein weiteres Protein im Eluat nachweisbar. Im OUCHTERLONY-Test finden sich Präzipitate der dissoziiert-

ten Proteine mit allen 4 Immunsereen: Mit Anti- γ A 2 schwache aber gut unterscheidbare Linien, mit Anti- γ M eine einzelne scharfe Linie. COOMBS-Serum (Anti- γ G) Präzipitiert in einem breiten unscharf konturierten Band, während das Präzipitat des Anti-Human-Serums aus 4 Einzel-
linien besteht: einer am stärksten ausgeprägten, scharf konturierten Linie, die ebenso wie ein Teil eines breiten Bandes nahe dem Stromareservoir in das Gebiet von Anti- γ A abbiegt. Zwischen diesen beiden liegen eng beieinander zwei weitere scharf abgesetzte Linien. Für die Präzipitate zwischen den Anti-Serum-Reservoirs gilt die gleiche oben gegebene Erklärung. Von den drei Gamma-Globulinen ist IgA am schwächsten, IgM stärker und IgG am deutlichsten dargestellt. Die kräftige Linie mit Anti-Human-Serum darf wiederum Albumin zugeschrieben werden.

Für den 3. Versuch zur Rückgewinnung der Proteine aus dem Agar wurden in einem Vorversuch optimale Wärmetrennungszeiten und Diffusionszeiten bestimmt (Tab. 9). Die Temperaturen wurden konstant gehalten (Wärmetrennung bei 55° C,

Tabelle 9: Versuche zur Bestimmung optimaler Wärmetrennungs- und Diffusionszeiten im Agar-Gel.
Der Intensitätsgrad (letzte Rubrik) wurde zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse festgesetzt

Test-Nr.	Inkubationsdauer b. 55°C	Diffusionszeit	Intensität der dargestellten Linien
1 a	1/2 Std.	14 Std.	+
b	1/2 Std.	25 Std.	++
2 a	1 Std.	14 Std.	+
b	1 Std.	25 Std.	++
c	1 Std.	48 Std.	+++
3 a	2 Std.	14 Std.	+
b	2 Std.	24 Std.	++
4 a	3 Std.	14 Std.	+
b	3 Std.	24 Std.	++
5 a	3 Std.	14 Std.	+
b	(nach 2 Std. aufgefüllt)	48 Std.	+++

Agar-Gel-Diffusion bei Zimmertemperatur). Der Stroma-Protein-Komplex (aus 10 ml Serum IV, BG O Anti-A 1:128 und 1 cm³ Stroma, 5mal ausgewaschen) wurde in die Reservoir von 11 OUCHTERLONY-Platten gefüllt, 2 bzw. 3 Stunden bei 55° C inkubiert und dann von jedem Paar eines für 14 Stunden, das andere für etwa 24 Stunden und in einem Fall ein drittes für 48 Stunden lang zur Diffusion gegen Antiserum aufgestellt. 2 Objektträger (Test 5) wurden nach 2 Stunden Brutschrank noch einmal mit Stromamaterial aufgefüllt und davon einer 48 Stunden lang zur Diffusion stehen gelassen. Die Position der Antiserum-Reservoir (Abb. 11, S. 52) entspricht den vorhergehenden OUCHTERLONY-Tests. IgA stellt sich nur in Test 5b (T 5b) dar, in den anderen Tests fehlt eine entsprechende Linie. Für alle Beispiele gilt, daß mit längerer Diffusionszeit die Linien intensiver dargestellt werden. Nach 48 Stunden (T 2c und T 5b) ergibt sich die stärkste Darstellung. Ein Vergleich der Objektträger mit unterschiedlichen Wärmetrennungszeiten, aber gleicher Diffusionszeit, bringt keine Unterschiede. Ein etwas günstigeres Bild als Test 2c zeigt Test 5b, der sich von T 4b in der Diffusionszeit (48 Stunden) unterscheidet und darin, daß das Stromareservoir nach 2 Stunden noch einmal aufgefüllt wurde. Faßt man die Ergebnisse zu einer optimalen Kombination der Versuchsbedingungen zusammen, so ergibt sich folgendes Vorgehen: Wärmetrennung 1-2 Stunden lang, Diffusionszeit 48 Stunden, Auffüllen der Stromareservoir nach der Hälfte der Zeit im Brutschrank. Eine kurze Beschreibung erfordert noch Test 2c (Abb. 11, S. 52): Die Linien von IgM und IgG zeigen einen teilweise ineinander übergehenden Verlauf. Die Ursache dafür liegt an der Art des COOMBS-Serums, das kein reines Anti- γ G-Serum ist, sondern vermutlich auch μ -Ketten-Antikörper enthält. Die Linien im Bereich von Anti- γ A und Anti-Human-Serum zeigen Kreuzungsphänomene, sie sind teilweise so breit, daß die Einzelkomponenten konfluieren.

Im 3. Hauptversuch wurden die ermittelten Reaktionszeiten angewendet, ein sehr großes Serumvolumen (160 ml Serum IV, BG O, Anti-A 1:128) mit $4,5 \text{ cm}^3$ Stroma (Verhältnis 1:35) absorbiert und im Überstand der Resttiter bestimmt, der bei 1:2 nur schwache Agglutinate aufwies. Als Vorprobe ergab sich auf einem aus der Agar-Platte herausgeschnittenen Agarstück eine Präzipitat-Bildung mit Anti-Human-Serum (223): Links und rechts über dem Reservoir ist je eine Linie dargestellt. Die Proteinlösung (1 ml) wurde zunächst auf dem Objektträger mit A_1 -Erythrozyten auf ihre agglutinierende Eigenschaft hin geprüft. Eine deutliche Agglutination bestätigte, daß Isohämagglutinine enthalten waren. Im Parallelversuch in der AGD auf dem Objektträger erscheinen die gewohnten Präzipitat-Linien mit Ausnahme von IgA. Zur Differenzierung der ungeklärten Protein-Zusammensetzung in der Eiweiß-Lösung wurden eine einfache und eine Immunelektrophorese mit Anti-Human-Serum vom Pferd (223) ausgeführt, die jedoch kein Protein darstellten. Erst mit Anti-Human-Serum vom Kaninchen (Fa. Behring) gelang es, verschiedene Proteinkomponenten nachzuweisen. Dabei zeigte sich, daß außer Gamma-G auch Albumin und Transferrin aus dem Agar rückgewonnen wurden. Im OUCHTERLONY-Test führte das Kaninchen-Serum ebenfalls zu einer intensiveren Darstellung der Proteinkomponenten als das Pferde-Serum. Die Proteinlösung wurde einmal gegen die 3 monospezifischen Immunsereen und das Anti-Human-Serum vom Kaninchen, zum anderen gegen COOMBS-Serum und Anti-Human-Serum vom Pferd getestet. IgA stellte sich nicht, IgM nur in einer schwachen Linie dar. Bei der Biuretbestimmung des Gesamtproteins im Eluat nach DITTEBRANDT ergab sich eine Menge Protein von 2 mg/ml.

Ein Zusatzversuch sollte die Eigenschaften von Stroma hinsichtlich seiner Bindungsfähigkeitsprüfen. Frisches, in feiner Verteilung suspendiertes Erythrozytenstroma verän-

dert nach Einfrieren auf -20°C und langsamem Auftauen seinen Zustand: Die Teilchen aggregieren zu groben klumpigen Massen, die sich durch Schütteln nur wenig verkleinern. Die Vermutung, daß frisches Stroma aufgrund einer größeren Oberfläche eine größere Menge Protein binden könnte, erwies sich im OUCHTERLONY-Test (Vergleich von beiden Stromaadsorbat-Suspensionen in gleichen Volumina) als nicht zutreffend. Im Gegenteil erscheinen auf dem Objektträger mit grobem Stroma deutlichere Linien, was mit der höheren Konzentration an Stroma-Material sowie allgemein mit der AGD-Technik erklärt werden kann, die bei geringen Unterschieden in der Präzipitat-Bildung keine quantitative Aussage zuläßt. Im 3. Versuch wurde folgendes festgestellt: Mit Hilfe von Immunelektrophorese und AGD können aus dem Agar gewonnene Proteine als Gamma-Globuline des Typs IgM, IgG, IgA sowie als Albumin und Transferrin differenziert werden. Obgleich in der Protein-Lösung eine kräftige Isohämagglutinin-Aktivität nachgewiesen wurde, können die dargestellten Gamma-Globuline nicht mit den Hämagglutininen gleichgesetzt werden.

In einem 4. Hauptversuch sollte noch einmal eine isolierte Protein-Lösung (aus 135 ml Serum V, BG O Anti-A 1:128, mit 1,013 g lyophilisiertem Stroma A_1 auf 2 Platten mit 5 Rinnen) besonders hinsichtlich ihres Gehaltes an Isoagglutininen und anderer Immunglobuline untersucht werden. In drei Kontroll-Versuchen in der AGD wurde das Material gegen verschiedene Antiseren getestet. Bei der bisher verwendeten Anordnung der Antiseren erscheinen alle drei Gamma-Globulin-Typen in deutlichen Linien, besonders intensiv IgA, am schwächsten IgM. Auf dem 2. Objektträger wurden AB-Substanz (Dade) als Antigen und Anti-Albumin-Serum vom Kaninchen als Antikörper gegen die dissoziierten Proteine getestet. Mit AB-Substanz zeigte sich keine Reaktion, während ein äußerst intensives, breites und

scharf konturiertes Band die Anwesenheit von Albumin beweist. In einem 3. Test (Abb. 12) wurden mit 5 Antiseren folgende Proteine nachgewiesen: IgA, IgM, IgG, Albumin und mit Anti-Human-Serum vom Pferd drei Eiweiß-Komponenten, von denen eine zum Teil mit IgG identisch ist. Mit AB-Substanz ergab sich wiederum keine Reaktion. Auf einer aus der Agarplatte herausgetrennten Probe wurden mit AB-Substanz (Merck, Sharp & Dohme), Anti- γ M und Anti-Human-Serum (223) die in den Agar diffundierten Proteine getestet. Mit den beiden Antiseren stellt sich eine ganze Reihe von Linien dar dagegen bildet sich kein Präzipitat mit AB-Substanz.

Die aus dem Agar exprimierte Proteinelösung (auf 2 ml eingeeengt) wurde mit verschiedenen Methoden auf ihre Protein-Anteile hin untersucht. Im OUCHTERLONY-Test (Abb. 13) stellten sich mit den spezifischen Immunseren sowie mit den Anti-Human-Seren von Pferd und Kaninchen alle erwarteten Proteine dar. Das mit Anti-Albumin-Serum identifizierte Albumin-Präzipitat setzt sich als breites Band in den Bereich der beiden Anti-Human-Seren fort. Unverdeckt von diesem Präzipitat liegt im Bereich der beiden Anti-Human-Seren zur Mitte zu eine deutliche, durchgehende Linie, die eine schwache Fortsetzung im Bereich des Anti- γ M-Serum in der IgM-Linie findet. Damit ist die Annahme gerechtfertigt, daß diese Linie zumindest teilweise auf Gamma-Globuline zurückzuführen ist. Die IgM-Komponente ist nur in einer schwachen Linie angedeutet. Da schon in Abb. 12 nur Spuren von IgM erscheinen, sind vermutlich von vornherein nur kleine Mengen dieser Immün-Globulin-Klasse adsorbiert worden bzw. vom Stroma dissoziiert. Keine der beiden AB-Substanzen reagiert mit den nachweislich anwesenden Isohämagglutininen. So ist es nicht möglich, im OUCHTERLONY-Test den Anteil der Isoagglutinine an den einzelnen dargestellten Immunglobulin-Klassen festzustellen. Die Immunelektrophorese (Abb. 14, eingeeengte

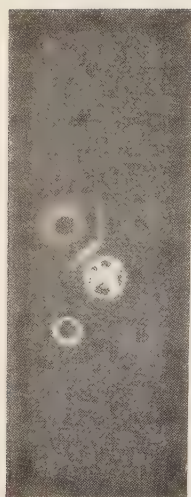


Bild 2a



Bild 2c

Abb. 11

1

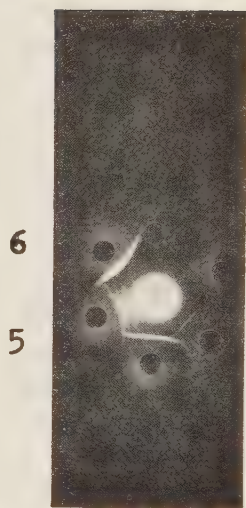


Abb. 12

1



4

AS
KaS
PL

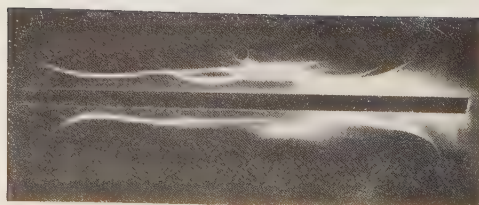


Abb. 14

Abb. 11: AGD-Test wärmedissoziierter Proteine zur Bestimmung optimaler Wärmetrennungs- und Diffusionszeiten. Test 2a und 2c: Trennungszeit 1 Stunde, Diffusionszeit 14 Stunden (Bild 2a) und 48 Stunden (Bild 2c). Antiseren: Anti- γ A (oben re.), Anti- γ M (unten re.), Anti- γ G (unten li.) und Anti-Human-Serum vom Pferd (oben li.)

Abb. 12: AGD-Test von wärmedissoziierten Proteinen (Versuch 4) gegen AB-Substanz (1), Anti- γ M (2), Anti- γ A (3), Anti- γ G (4), Anti-Human-Serum vom Pferd (5) und Anti-Albumin-Serum (6)

Abb. 13: AGD-Test der in Versuch 4 gewonnenen Protein-Lösung (stark eingeeengt) mit den Antiseren: Anti-Human-Serum vom Pferd (1), Anti- γ M (2), Anti- γ A (3), Anti- γ G (4), Anti-Albumin (5) und Anti-Human-Serum vom Kaninchen (6).

Abb. 14: Immunelektrophoretischer Vergleich der Proteine der gewonnenen Lösung von Versuch 4 (PL) mit denen des Ausgangs-Serums (AS) gegen Anti-Human-Serum vom Kaninchen (KaS)

Proteinlösung in 5 mm weitem Reservoir) zeigt deutliche Linien für IgG, Albumin und Transferrin, sowie angedeutet für weitere in Spuren vorhandene Eiweiß-Fractionen. Auf dem Objektträger agglutinierte die Lösung A₁-Erythrozyten schnell und kräftig, während sie mit B-Erythrozyten keine Reaktion zeigte. Die Titerbestimmung ergab einen Anti-A-Titer von 1:32. Bei der Biuret-Bestimmung wurde eine Gesamt-Eiweißmenge von 3,7 mg/ml ermittelt.

In weiteren Versuchen sollte die quantitative Zuordnung der Isoagglutinine in der Proteinlösung zu den einzelnen Gamma-Globulin-Klassen nach dem Prinzip des COOMBS-Tests erfolgen. Dazu wurde das Material in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit engen Intervallen verdünnt. Ohne vorheriges Zentrifugieren ergab sich ein Endtiter von 1:12. Für den im Vergleich zur vorhergehenden Bestimmung niedri-

geren Titer ist möglicherweise auch die 12 Tage dauernde Aufbewahrung im Kühlschrank verantwortlich zu machen. Die Erythrozyten der Verdünnungen 1:12, 1:16, 1:20 und 1:24 wurden ausgewaschen und nacheinander mit den drei monospezifischen Antiseren vom Kaninchen auf dem Objektträger auf Agglutination hin geprüft. Alle 4 Tests verliefen positiv. Wie weiter festgestellt wurde, ergaben auch die Agglutinations-Versuche mit den Erythrozyten der höheren Verdünnungs-Stufen der Protein-Lösung das gleiche positive Ergebnis (höchste Verdünnung 1:80). Da in diesen Verdünnungs-Bereichen eine ausreichende Antikörper-Konzentration auf den Erythrozyten nicht mehr erwartet werden durfte, mußte ein interferierendes unspezifisches Reaktionssystem angenommen werden. Zur Klärung dieser Frage wurde das gleiche unveränderte Erythrozyten-Ausgangsmaterial untersucht, das im vorhergehenden Experiment zur Inkubation mit der Proteinlösung diente. Auch hierbei zeigte sich die gleiche prompte Agglutination mit den Antiseren vom Kaninchen. Die Kontrolle mit physiologischer NaCl-Lösung blieb bei allen Versuchen negativ. Eine deutliche Agglutination trat auch ein, als die Versuche mit kommerziellen Test-Erythrozyten der Fa. Merz und Dade SA (Bern) wiederholt wurden.

Aus der vorliegenden Versuchsreihe sind folgende Schlußfolgerungen zu ziehen:

1. Mit Erythrozyten-Stroma können größere Mengen an Isohämagglutininen aus dem Serum adsorbiert werden. Sie erscheinen, wie die Versuche zeigen, nach Wärmetrennung im Agar und sind im OUCHTERLONY-Test Bestandteil von IgA-, IgG- und IgM-Präzipitaten.
2. Erythrozyten-Membranen binden außer Isohämagglutininen stets in größeren Mengen verschiedene Serumproteine, die nach Wärmetrennung im OUCHTERLONY-Test nachweisbar sind, vor allem Albumin, Transferrin und Gamma-Globuline.

3. Human-Erythrozyten besitzen die Eigenschaft, mit Kaninchenserum zu agglutinieren.

c) Eigenschaften der Erythrozytenmembran gegenüber Kaninchenserum

Die Feststellung, daß normale, native, ausgewaschene Human-Erythrozyten mit Kaninchen-Serum eine Agglutinationsreaktion zeigen, ergab sich bei der Erprobung eines Systems zum Nachweis der 3 Gamma-Globulin-Klassen der Isohämagglutinine. Sie betrifft auch das Problem der an Erythrozyten-Membranen gebundenen Serumproteine. Außerdem werden Fragen im Zusammenhang mit den Vorstellungen über den üblichen COOMS-Test aufgeworfen, der mit Kaninchenserum ausgeführt wird. So erscheint es gerechtfertigt, in einigen Agglutinationsversuchen Besonderheiten dieses Systems zu untersuchen (Tab. 10).

Test-Erythrozyten	COOMBS-Serum Behring	Anti-Human Gamma-Glob. Serum, Kan.	Kaninchen Leerserum	NaCl Kontrolle
Test-Erythrozyten, Dade	Ø	+	+	Ø
Erythrozyten I (6 mal ausgewaschen)	Ø	+ sofort	+ nach 5 Min.	Ø
Erythrozyten II (4 mal ausgewaschen)	Ø	+ sofort	+ nach 5 Min.	Ø
Erythrozyten Myelom-Patient	+ sofort	+ sofort	+ nach 5 Min.	Ø

Tab. 10: Agglutinationsversuche mit Human-Erythrozyten und Kaninchen-Seren

Mit den 3%igen Testerythrozyten der Fa. Merz und Dade wurden folgende Seren getestet: ein Anti-Human-Gamma-Globulin-Serum vom Kaninchen, das eine starke Agglutination zeigte, sowie das zur Routine-Untersuchung verwendete COOMBS-Serum der Fa. Behring, das als "präzipitierendes Immunserum gegen Gamma-Globulin (Immunglobulin γ G, γ A, γ M) sowie gegen β -Globulin (Komplementfaktoren) menschlichen Serums" bezeichnet ist. Mit diesem Serum bleibt die Agglutinationsreaktion aus. Weiterhin wurde ein Kaninchenserum, das von Tieren stammte, die nicht mit fremdem Serum immunisiert worden waren, mit den Test-Erythrozyten vermischt. Dabei trat eine deutliche Agglutination auf. Mit einer Suspension von 6 mal ausgewaschenen Human-Erythrozyten wurden die gleichen Kaninchen-Seren auf Agglutination getestet mit dem gleichen Ergebnis. Zur weiteren Sicherung dieser Befunde wurde das Agglutinationsverhalten der Erythrozyten eines Myelompatienten mit normalen Erythrozyten verglichen. Die Testung erfolgte mit den drei genannten Kaninchen-Seren. Die Erythrozyten des Myelomkranken agglutinierten stark mit allen 3 Seren einschließlich COOMBS-Serum, mit Kaninchen-Leerserum nach etwa 5 Minuten. Die normalen Erythrozyten reagierten dagegen nicht mit dem COOMBS-Serum, dagegen mit den anderen wie in den früheren Versuchen. Diese Experimente zeigen, daß sich das COOMBS-Serum von Behring im Hinblick auf die Agglutinationsfähigkeit von den anderen verwendeten Kaninchenseren wesentlich unterscheidet. Dazu wurden folgende Feststellungen gemacht:

1. Im OUCHTERLONY-Test ergibt sich bei der Testung des COOMBS-Serums gegen Anti-Kaninchen-Serum (Ziege), Anti-Ziegen-Serum (Kaninchen) und Anti-Pferde-Serum (Kaninchen), daß ein Mischserum vorliegt, das Kaninchen- und Ziegen-Serum enthält.

2. RACE und COOMBS (1945 und 1947) geben dan, daß sie das verwendete Kaninchenserum dreimal mit Erythrozyten der BG A, B und O adsorbieren mußten, bevor es zum Nachweis von inkompletten Antikörpern auf der Erythrozyten-Oberfläche geeignet war.

Die Anwendung von monospezifischen Antiseren vom Kaninchen zum Zwecke eines Nachweises von Hämagglutininen auf Erythrozyten im Antiglobulin-Test würde demnach eine entsprechende Adsorption der drei Antiseren erfordern. Ein solcher Adsorptions-Versuch wurde mit dem Anti-Human-Gamma-Globulin-Serum durchgeführt und nach 2 Adsorptionen mit A-Erythrozyten ein deutlicher Schwund der Agglutinations-Fähigkeit des Serums festgestellt.

4. Trennung der Isoagglutinine von anderen mit Stroma reagierenden Gamma-Globulinen des Serums

Die bisherigen Experimente hatten einerseits gezeigt, daß Isohämagglutinine aus Humanserum mit entsprechendem Stroma adsorbiert werden und mit der AGD-Technik darstellbar sind. Andererseits wurde nachgewiesen, daß Erythrozytenstroma gleichzeitig mit den Isoagglutininen verschiedene andere Serumproteine bindet, u.a. auch Gamma-Globuline, die im OUCHTERLONY-Test in Konkurrenz zu den Hämagglutininen treten und deren Differenzierung unmöglich machen. In den folgenden Untersuchungen sollen Möglichkeiten zur Trennung der Isoagglutinine von unspezifischen Gamma-Globulinen aufgezeigt werden. Zwei Wege bieten sich an: Einmal kann bei der Stromaadsorption die Fixation anderer Gamma-Globuline außer Hämagglutininen verhindert werden (durch besondere Präparation der Erythrozytenmembranen). Zum anderen kann nach vollständiger Adsorption der Versuch unternommen werden, selektiv nur den Isoagglutinin-Anteil oder den unspezifisch haftenden Proteinanteil abzutrennen.

a) Versuche zur Beseitigung der Affinität von Stroma
zu unspezifischen Serumproteinen

In einer ersten Versuchsreihe wurde Erythrozytenstroma mit 0,3%iger Papainlösung behandelt mit dem Ziel, die Protein-Bindungskapazität des Stromas zu beseitigen, während die Polysaccharid-Valenzen für die Agglutinin-Bindung erhalten bleiben sollten. Zum Nachweis adsorbierter Eiweiße am Stroma diente die beschriebene Methode der Wärmetrennung mit anschließender AGD. Der erste Teil der Versuche galt der Präparation des Stromas mit 0,3%iger Papainlösung mit anschließender Prüfung des Materials auf Reinheit bezüglich gebundener Proteine des Ursprungsblutes. Zum Vergleich wurde das gleiche Stroma ohne vorherige Präparation untersucht. Hier zeigten sich bemerkenswerterweise sowohl bei einer Temperatur von 22° C als auch bei 53° C gleich starke Präzipitatlinien mit Anti-Human-Serum und Anti- γ G-Serum. IgA war nur in Spuren, IgM nicht nachweisbar. Nach 30 Minuten Papaineinwirkung auf das gleiche Stroma-Material stellte sich mit Anti-Human-Serum eine viel schwächere Linie, mit Anti- γ G nur noch andeutungsweise ein Präzipitat dar. IgA- und IgM-Linien fehlen. Nach einer Einwirkungszeit von 1 Stunde (Stroma I) und 2 Stunden (Stroma II) wurde IgG ebenso wie IgA und IgM nicht mehr dargestellt, mit Anti-Human-Serum erscheinen nur noch schwache Linien. Damit ist ein Stroma gewonnen, das keine nachweisbaren Gamma-Globuline mehr besitzt.

Im 2. Teil der Untersuchungen wurden diese beiden Stromapräparate (Stroma I und II) mit AB-Serum inkubiert und anschließend ausgewaschen. Der Vergleich der beiden Präparate in der AGD zeigt keinen Unterschied zu einem unbehandelten aber gleichfalls mit AB-Serum adsorbierten Stroma. Demnach wurde die Fähigkeit des Stromas zur unspezifischen Bindung durch fermentativen Eingriff mit 0,3%iger Papain-

Lösung nicht aufgehoben. Entsprechende Resultate ergaben sich auch nach Behandlung mit 1/2%iger Trypsin-Lösung sowie 0,3%iger Papainlösung mit Zusatz von 1/2 m Cysteiniumchlorid-Lösung.

Zur Prüfung der Agglutinationsfähigkeit von Erythrozyten-Membranen nach Papainisierung wurden ausgewaschene Erythrozyten in einem Parallelversuch wie das Stroma behandelt. Nach 1/2, 1 und 2 Stunden Einwirkungszeit trat keine Hämolyse ein, die Erythrozyten agglutinierten unverändert stark mit Testseren, der Kontrollversuch mit AB-Serum blieb negativ.

Diese Untersuchungen haben folgendes gezeigt:

1. Mit der Papainbehandlung bzw. Papain-Cystein-Behandlung kann primär Protein-freies Stroma gewonnen werden.
2. Das Hauptproblem, nämlich die Vermeidung der parallelen Adsorption von Isoagglutininen und anderer Immunglobuline ist durch Fermenteinwirkung auf Erythrozyten-Stroma nicht zu lösen.

- b) Versuche zur selektiven Abspaltung der Isoagglutinine bzw. der unspezifischen Gamma-Globuline von Stromaadsorbat

Mit N-Acetyl-Galactosamin sollte nach KAPLAN und KABAT (1966) die immunologische Bindung von Isohämagglutininen und Stroma-Antigen gelöst werden ohne Beeinträchtigung der unspezifischen Fixation der anderen Gamma-Globuline. Die Konzentrationen von adsorbiertem Stroma und N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc) waren relativ hoch. Das Ergebnis in der AGD bei Zimmertemperatur zeigte, daß bei dieser Temperatur bereits beträchtliche Proteinmengen dissoziieren (Kontrollversuch mit nicht adsorbiertem Stroma), so daß eine Unter-

scheidung der von GalNac getrennten Isoagglutinine von anderen Gamma-Globulinen wiederum nicht möglich wurde. Andererseits wird durch dieses Ergebnis eine Möglichkeit zur Lösung des Problems in einer anderen Richtung angedeutet: Eine isolierte Abtrennung der unspezifischen Immunglobuline bei niedrigen Temperaturen unter Erhaltung der Hämagglutininbindung. Vor Anwendung dieser Methode wurde in einem ersten Schritt Stroma auf thermischem Weg von den aus dem Ausgangsblut stammenden Serumproteinen gereinigt. In der AGD ist kein Serumprotein mehr nachweisbar. In einem 2. Schritt wurde das gereinigte Stroma absorbiert (jeweils 1 ml Stroma B mit 50 ml Serum Anti-B, Titer 1:64 bzw. mit 50 ml AB-Serum zur Kontrolle), gewaschen und 3 mal nacheinander in einem großen Volumen physiologischer NaCl-Lösung jeweils 12 Stunden suspendiert. Die anschließende Untersuchung des Stromas mit Wärmetrennung und AGD zeigte, daß sowohl mit Agglutininhaltigem Serum als auch mit AB-Serum inkubiertes Stroma kein nachweisbares Protein mehr enthielt, sei es, daß die Absorptionszeit zu kurz bemessen war, sei es, daß der ausgedehnte Trennungsvorgang auch Isohämagglutinine betroffen hat. In weiteren Versuchen wäre der Frage nachzugehen, wie Adsorptionsbedingungen und Trennungsbedingungen einzurichten sind, um möglicherweise unspezifische Proteine abzulösen ohne nennenswerte Verluste gebundener Isohämagglutinine. Läßt sich damit der entscheidende Schritt der Trennung der Isoagglutinine von anderen Serumproteinen verwirklichen, zu dem ein erster Schritt mit der Reinigung des absorbierenden Stromas mit Papainlösung und auf thermischem Weg hier getan wurde, so wäre die Voraussetzung dafür geschaffen, Isohämagglutinine durch Stromaabsorption in der AGD quantitativ nachzuweisen.

D) DISKUSSION

Die grundlegende Voraussetzung für die hier unternommenen Untersuchungen war die Feststellung der Autoren KUNKEL und ROCKEY, RAWSON und ABELSON sowie ISHIZAKA aus den Jahren 1963 bis 1965, auf die in der Einleitung bereits hingewiesen wurde, wonach die in einem Serum anzutreffenden Isoagglutinine des ABC-Systems grundsätzlich allen 3 Immunglobulinklassen angehören. Mit der Frage, welchen Anteil jede dieser 3 Klassen an den Gesamttagglutininen aufweist, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

Eine quantitative Aussage über die Gesamttagglutinine, ebenso über die Einzelkomponenten IgA, IgG und IgM, erscheint auf zwei Wegen möglich: Einmal kann die agglutinierende Aktivität als Maß für die Quantitäten der Agglutinine benutzt werden. Diese Methode wendeten wir bei der Titrierung im Reihenverdünnungstest an. Die zweite Möglichkeit besteht in der Bestimmung der tatsächlichen Mengen an Gesamt-Agglutininen und deren Einzelkomponenten in mg Protein. Dieses Verfahren birgt, wie sich zeigte, erhebliche Schwierigkeiten in sich. Zur Abgrenzung gegen diese zweite Form der Angabe tatsächlicher Agglutinin-Mengen wurde im ersten Fall die Bezeichnung "Isoagglutinin-Aktivität" benutzt. Von wesentlicher Bedeutung zur Beurteilung quantitativer Aussagen, gleich welcher Art, sind die biochemischen und immunologischen Eigenschaften der 3 Immunglobuline, von denen Molekulargewichte und Zahl der antideterminierenden Gruppen genannt seien. IgA liegt nach ISHIZAKA (1964) in monomerer und polymerer Form vor, die beide agglutinierende Eigenschaft besitzen, jedoch eine verschiedene Affinität zu Erythrozyten besitzen. Die Sedimentationskonstanten werden mit 6,9 (nach NEWCOMB 1968) und zwischen 7 und 19 (nach RAWSON und ABELSON 1964) angegeben.

IgG (MG 180 000) besitzt 2 Antigen-Bindungsstellen am Molekül. IgM, das sich aus 5 Einheiten mit den MG 180 000 (Gesamt-MG um 900 000) aufbaut, ist pentavalent (nach ONOUE 1968).

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, hat die getrennte und quantitative Bestimmung der drei Isoagglutinin-Klassen eine praktische Bedeutung für die Klinik als Maßstab für die Fähigkeit des Immunsystems zur Bildung humoraler Antikörper und damit auch zur Erfassung isolierter Defekte innerhalb dieses Systems.

Im ersten Teil der Untersuchungen wurde der Anteil der IgM-Aktivität an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität in 90 Seren (je 30 Seren der BG A, B und O) bestimmt. Grundlage für diesen Versuch ist die Thermolabilität des Makroglobulins IgM, das bei Erhitzung auf 65° C seine Antikörper-Aktivität verliert (JOHNSON und HOLBOROW 1961, SCHIERZ 1967). In Titrationsversuchen wurde vor und nach Inaktivierung die dem Immunglobulin IgM zuzuschreibende Titerdifferenz bestimmt.

In diesem Zusammenhang war es zunächst von Interesse, die Gesamttagglutinin-Aktivität in den 90 Seren genauer zu betrachten, größere Differenzen zwischen den einzelnen Seren zu erklären und mögliche grundsätzliche Unterschiede im Gesamt-Titer-Niveau der 3 BG festzustellen. Der Vergleich wurde mit statistischen Mitteln geführt, um der Gefahr spekulativer Schlußfolgerungen zu entgehen. Als Vergleichsgröße wurde der Mittelwert benutzt. Das Beispiel der BG O (Tab. 3) zeigt, wie schwierig es ist, ohne Statistik zu entscheiden, ob zwischen Anti-A und Anti-B ein signifikanter Unterschied besteht. Die beiden Voraussetzungen zum Mittelwertvergleich, gleiche Varianzen und Übereinstimmung der Häufigkeitsverteilungen mit der Gauß'schen Normalver-

teilung (Tab. 3) sind für unsere Kurven erfüllt. Eine Ausnahme liegt nur bei BG O, Anti-A vor, deren Häufigkeitsverteilung nur "mäßig angepaßt" ist. Wie aus Abb. 2 ersichtlich, findet sich beim Titerwert 1:64 eine starke Häufung der Werte. Mit einer größeren Zahl von untersuchten Seren sind solche Häufungen auszuschließen. Da allgemein eine Anzahl von 30 Probanden bei einfacher Fragestellung zur Klärung der Signifikanzfrage ausreichen, verwendeten wir für jede Agglutiningruppe 30 Seren (120 Verdünnungsreihen). Dabei können zufällige Häufungen auftreten. Gründe, die auch bei der genannten BG eine normalverteilte Grundgesamtheit vermuten lassen, wurden bereits genannt. In der Literatur sind zum Thema unterschiedlicher Agglutinin-Aktivitäten in den BG nur wenig Angaben aus der letzten Zeit aufzufinden. Größere Untersuchungen liegen 40 Jahre zurück, die Ergebnisse sind nicht einheitlich. In unserer Arbeit stellten sich im wesentlichen zwei Resultate heraus:

Die Beobachtung, daß Anti-A eine signifikant höhere Agglutinin-Aktivität aufweist als Anti-B, sowohl in BG O als auch beim Vergleich der BG A und B, steht in Einklang mit den Ergebnissen der umfangreichen Untersuchungen von THOMSEN und KETTEL aus dem Jahre 1929. An eindrucksvollen Diagrammen demonstrierten sie, daß " α -Agglutinin kräftiger wirkt als β -Agglutinin." Diese Ergebnisse standen, wie die Autoren selbst feststellten, im Widerspruch zu den Resultaten von SCHIFF und MENDLOWICZ (1926), die eine solche Gesetzmäßigkeit ablehnten. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen fanden YOKOYAMA (1967) und STEFFES (1966) für Anti-A höhere Titer als für Anti-B.

Das zweite Resultat unserer Experimente zur Frage eines Unterschiedes der mittleren Titerhöhe innerhalb der gleichnamigen Agglutiningruppen Anti-A und Anti-B in verschiedenen BG steht nicht in Übereinstimmung mit den Angaben von

THOMSEN und KETTEL sowie SCHIFF und MENDLOWICZ. Während wir einen signifikanten Unterschied weder hinsichtlich der Anti-A-Aktivitäten der BG O und B, noch der Anti-B-Aktivitäten der BG O und A beobachteten, stellten die genannten Autoren geringe Unterschiede fest. THOMSEN und KETTEL urteilten: "Der Unterschied ist nicht so groß, als daß er nicht auf Zufall beruhen könnte." SCHIFF und MENDLOWICZ fassen die Anti-A und Anti-B-Aktivitäten der entsprechenden BG zum Vergleich zusammen, ein Hinweis dafür, daß sie mit gemeinsamen Grundgesamtheiten rechneten. NIJENHUIS (1962) fand bei heterozygoten Zwillingspaaren für Anti-A (BG O und B) gleich hohe Endtiter.

Eine einzige größere Untersuchung aus der letzten Zeit über quantitative Unterschiede der Isoagglutinin-Aktivitäten in den verschiedenen BG stammt von GRUNDBACHER (1967). Seine gleichfalls im Reihenverdünnungstest ermittelten Befunde stimmen mit unseren gut überein mit einer Ausnahme: Die durchschnittliche Agglutinin-Aktivität von Anti-A der BG B liegt bei ihm im Vergleich zu den anderen Agglutininen besonders niedrig.

Die Ursache für die uneinheitlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren beim Vergleich der Agglutinin-Aktivitäten könnte sowohl in der Auswahl des Untersuchungs-Materials als auch in Unterschieden der serologischen Technik liegen. Die von uns verwendeten Seren stammten von Patienten verschiedener Kliniken. Von den genannten Autoren benutzte nur einer (GRUNDBACHER) ausschließlich Serum von Gesunden. Damit erhebt sich die Frage, ob sich die Test-Ergebnisse der Seren von Normalpersonen wesentlich von denen Kranker unterscheiden. In der Literatur findet sich eine Reihe von Angaben zum Thema einer Abhängigkeit der Hämagglutinin-Titer von bestimmten Krankheiten und verschiedenen anderen Bedingungen wie Geschlecht, Alter, Jah-

reszeit und körperliche Belastungen. Besonders untersucht wurden in dieser Hinsicht Infektionskrankheiten, da man eine Korrelation zwischen Immunitätslage und Agglutinititer erwartete. Bei Tuberkulose-Kranken stellte 1930 HÖLSCHER eine Erniedrigung des Titerneaus fest, ZANTOP (1930) fand keinen Unterschied zu Gesunden. Toxische Diphtherie soll nach STRÖDER (1949) zu einem "Isoagglutininansturz" führen. SCHIFF und MENDLOWICZ fanden bei Leukämie-Patienten "häufig niedrigere Titer". Die meisten Autoren lehnen jedoch einen Einfluß von Krankheiten auf den Isoagglutinin-Titer ab. (POTHMANN und GRÜN 1949, THOMSEN und KETTEL 1929, SCHIFF und MENDLOWICZ 1926 mit Ausnahme der Leukämie.) Natürlicherweise ist davon ausgeschlossen das Antikörper-Mangel-Syndrom (AMS), bei dem mit einer Erniedrigung der Agglutinin-Titer zu rechnen ist. Bei unseren Untersuchungen fanden sich nur 4 Patienten mit den genannten Erkrankungen (Nr. 27, 51, 73 und 90). Die ermittelten Titerwerte zeigten keine Besonderheiten, bei den Tbk-Kranken lagen sie sogar verhältnismäßig hoch. Ein Einfluß wird ferner der Jahreszeit zugeschrieben. STONE (1956) und SHAW und STONE (1957) finden Höchstwerte im Spätsommer. Dagegen wird von GRUNDBACHER (1968) aufgrund eingehender Untersuchung ein solcher Einfluß bestritten. WILDFÜHR (1945) beobachtete einen Titerabfall bei gesteigerter körperlicher Belastung.

Alle in der Literatur vorliegenden Erfahrungen deuten darauf hin, daß zwischen den von uns verwendeten Patientenseren und Seren einer Normal-Population kein grundsätzlicher Unterschied hinsichtlich Agglutinin-Aktivität zu erwarten ist.

Als weitere Faktoren, die in ihrer Wirkung auf den Agglutinin-Titer untersucht wurden, nehmen Geschlecht und Alter einen besonderen Raum ein. In unseren Untersuchungen wur-

den in jeder BG eine gleiche Anzahl Seren von männlichen und weiblichen Personen untersucht. Die Zahl von 15 Seren für jedes Geschlecht in einer BG reicht nicht aus, um signifikante Aussagen zu machen. Es läßt sich somit nur die Tendenz in den BG O und A zu höheren Titern für die weiblichen Personen ablesen, während in BG B keine Unterschiede zu finden sind. SCHIFF und MENDLOWICZ beobachteten keine Differenzen, GRUNDBACHER dagegen signifikant höhere Titer bei weiblichen Personen der Altersklasse von 5 - 19 Jahren. Interessant ist ein Vergleich der Agglutinin-Titer in verschiedenen Altersklassen, da sich daraus möglicherweise Rückschlüsse auf die Altersabhängigkeit der Aktivität des immunologischen Systems ziehen lassen. Wir faßten zum Altersvergleich jeweils die Seren der Anti-A bzw. Anti-B-Agglutinine zusammen, da sich bei unseren Experimenten ergeben hatte, daß gleichnamige Agglutinine gleichen Grundgesamtheiten angehören. Trotzdem war die Anzahl der Seren in den vier Altersklassen zu klein, um bindende Aussagen zuzulassen. Unsere Beobachtungen stimmen aber mit den Ergebnissen von GRUNDBACHER überein, der zwischen dem 15. und 60. Lebensjahr nur einen geringen Rückgang der Agglutinin-Titer feststellte, während vor dieser Zeit ein steiler Anstieg und danach ein zwar allmählicher aber im Vergleich stärkerer Abfall beobachtet wurde.

Als weitere Ursache für divergierende Ergebnisse verschiedener Autoren müssen Unzulänglichkeiten des Testsystems in Betracht gezogen werden. Abgesehen davon, daß die absolute Titerhöhe abhängig ist von den Einzelheiten des Tests (z.B. Testerythrozyten-Konzentration), spielt bei der Befundung die subjektive Einstellung des Untersuchers eine Rolle. Einige Autoren (YOKOYAMA 1967, NIJENHUIS 1962) benutzen ein System mit einer Reihe von Agglutinationsgraden. Bei unseren Untersuchungen wurde der Endtiter nach dem Kriterium einer makroskopisch eindeutigen Agglutina-

tion bestimmt. Bei der Beurteilung der Befunde wurde der in der allgemeinen Serologie beim Reihen-Verdünnungs-Test geltende Grundsatz beachtet, daß der Endtiter eine Fehlerbreite von ± 1 Titerstufe aufweisen kann, wobei in der geometrischen Verdünnungs-Reihe der Unterschied von einer Titerstufe immerhin einer Halbierung der Antikörper-Konzentration zum vorangehenden Teströhrchen entspricht. Von Wichtigkeit ist darüber hinaus das Problem der Test-Erythrozyten. Die stets einheitliche Antigen-Aktivität der Erythrozyten ist Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Testergebnisse. SCHIFF und MENDLOWICZ 1926 benutzten für alle Versuche gleiche Test-Erythrozyten. THOMSEN und KETTEL (1929) untersuchten die Rezeptor-Aktivität der Erythrozyten und stellten für etwa 85% aller Spender der BG A und B übereinstimmende Werte fest, für den Rest eine zumeist niedrigere Aktivität. Bei unseren Versuchen wurden verschiedene Test-Erythrozyten (bei BG A stets vom Typ A₁) verwendet, die mit standardisierten Testseren quantitativ gleichsinnig reagierten. Bei den vergleichenden Untersuchungen (vor und nach Hitzeinaktivierung) wurden stets dieselben Erythrozyten-Suspensionen verwendet. Insgesamt muß festgestellt werden, daß ein Vergleich absoluter Titerwerte von Autor zu Autor nicht zweckmäßig ist, während relative Titerdifferenzen mit Vorbehalt vergleichbar sind.

Um zuverlässige Ergebnisse bei der Bestimmung der Isoagglutinin-Aktivität zu gewinnen, müßten in der Methodik Verbesserungen getroffen werden. Möglicherweise bietet die zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen der Agglutinations-Reaktion von FILITTI und WURMSER (1954, 1957, 1966), HUMMEL (1966) sowie GREENDYKE und SWISHER (1968) verwendete Zell-Zähl-Methode mit Partikel-Zähl-Maschinen ("Coulter-Counter") eine Grundlage zur Standardisierung der Endtiter-Bestimmung. Allerdings ist diese Technik wesentlich aufwendiger.

Die Erscheinung, die sich bei unseren Untersuchungen ergab, daß insgesamt Anti-A stärker als Anti-B agglutiniert, und daß Anti-A in beiden Agglutiningruppen (BG B und O) gleich stark agglutiniert, ebenso Anti-B (BG A und O), kann einmal affinitäts- zum anderen konzentrationsbedingt sein. Affinitätsunterschiede der Agglutinations-Systeme der A₁- und B-Erythrozyten sind durchaus möglich und besonderen Untersuchungen vorbehalten. Andererseits können die durchschnittlichen Agglutininmengen in den beiden Systemen unterschiedlich hoch sein. Dabei tritt die Frage in den Vordergrund, welche Anteile die 3 Gamma-Globulin-Klassen an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität besitzen und welche Unterschiede zwischen den beiden Agglutinin-Gruppen bestehen. Dieser Frage gingen wir in unseren Experimenten nach.

Durch das Verfahren der IgM-Inaktivierung bei 65° C wurde ein Abfall der Endtiterwerte um 1-3 Stufen in der überwiegenden Zahl der Seren festgestellt. Während ISHIZAKA 1965 sowohl für IgM als auch für IgA einen Verlust der Aktivität nach Behandlung mit Merkaptopäthanol beobachtete, findet sich in der Literatur nur für IgM die Feststellung einer Thermolabilität bei 65° C (JOHNSON und HOLBOROW 1961, SCHIERZ 1967). Den Aktivitätsverlust dürfen wir daher der IgM-Fraktion zuschreiben. Aus der Zahl der Stufen, die der Endtiter abfiel, lassen sich gewisse Schlüsse über den Aktivitäts-Anteil von IgM ziehen. Ein Abfall um beispielsweise 2 Stufen (bei allen BG häufigster Wert) würde bedeuten, daß die IgM-Aktivität das 4-fache der Aktivitäten der beiden anderen Fraktionen in diesen Seren aufweist. Über die tatsächlichen Isoagglutinin-Mengen des Typs IgM in mg Protein oder mg N/ml lassen sich aber keine unmittelbaren Schlüsse ziehen, da sicher ist, daß wesentlich geringere Mengen von IgM-Molekülen als von IgG und IgA nötig sind, um eine gleiche definierte Hämagglu-

tion zu bewirken (ISHIZAKA 1965. GREENBURY 1963, HUMMEL 1966). Einer überwiegenden oder gegenüber IgA und IgG gleichstarken IgM-Aktivität der Agglutinine entsprechen demnach keinesfalls höhere oder gleiche IgM-Agglutinin-Konzentrationen.

Bei unseren Versuchen konnten wir eine Abhängigkeit des Titerverlustes von der Ausgangs-Titerhöhe ebenso wenig beobachten wie eine Korrelation zwischen BG und IgM-Anteil. Auffällig schien zunächst, daß die Kurven des Titer-Verlustes bei BG O stärker streuen als bei BG A und B. Statistisch ließ sich ein signifikanter Unterschied der Streuungen jedoch nicht sicher nachweisen. Der zum Mittelwert-Vergleich außerdem notwendige Nachweis einer Übereinstimmung der Kurven mit der Normalverteilung ließ sich nicht erbringen, da für diese statistische Berechnung eine größere Zahl von Titer-Intervallen nötig gewesen wäre. Der Mittelwert-Vergleich stützt sich demnach auf die Annahme einer Übereinstimmung, da einmal der Verlauf der Kurven dafür spricht, zum anderen für das gleiche Material (Isohämagglutinine) im vorangehenden Versuch der Nachweis der Anpassung an die Normalverteilung erbracht worden war. Die Konsequenz aus der Feststellung, daß die Mittelwerte nicht signifikant voneinander abweichen, ist die Übereinstimmung der mittleren IgM-Aktivität in allen 3 BG. Die Entscheidung, wie weit der IgM-Anteil in den Seren jeweils tatsächlich der Titerdifferenz entspricht, läßt sich wegen der Fehlerbreite des Systems (1 Titerstufe in beiden Richtungen) in keinem Fall treffen. Ein sicher sehr hoher IgM-Anteil ist aus einem Abfall um 4 Titerstufen zu schließen, ein sehr niedriger bei Ausbleiben eines Titerverlustes. In BG O finden sich 4 Seren mit einem Abfall um mehr als 4 Titerstufen in einer Agglutiningruppe, während in der entsprechenden anderen Agglutiningruppe jeweils kein so hoher IgM-Anteil gefunden wurde. Der Befund

stark divergierender Titerabfälle der beiden Agglutinine in den Seren der BG O ist nicht die Regel (von den 30 Seren der BG O zeigen 15 den gleichen IgM-Anteil, 9 differieren um 1 Stufe). Der IgM-Anteil der beiden Agglutinine ist danach in der überwiegenden Mehrzahl der Seren der BG O gleich groß. Bei den 4 Seren (Nr. 13, 21, 25, 27) läßt sich eine Erklärung aus der Krankheit für den hohen IgM-Gehalt nicht ableiten. Ob ein Zusammenhang zwischen der extrem hohen IgM-Aktivität bei Serum Nr. 27 (Abfall um 6 Titerstufen, s. Abb. 6) und der klinischen Diagnose Tuberkulose besteht, ist zweifelhaft. Unter den Seren der BG A und B finden sich zwei (Nr. 55 und 85) mit hohem IgM-Gehalt. Bei dem einen Serum (Nr. 85) mit der Diagnose "Panmyelopathie" erscheint ein Zusammenhang zwischen Erkrankung und hoher IgM-Aktivität denkbar.

Interessant ist, vor allem im Zusammenhang mit der Frage einer diagnostischen Verwertbarkeit der Technik der IgM-Inaktivierung für das AMS-Syndrom, die Betrachtung der Seren ohne Titerabfall.

Wegen der begrenzten Genauigkeit des Test-System, wird man sich bei den Seren ohne Titer-Differenzen mit der Feststellung begnügen müssen, daß IgM-Antikörper, falls überhaupt, in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind. Auffallend war ein Serum der BG O (Nr. 10), das keinen Titerverlust in beiden Agglutinin-Gruppen zeigte, so daß hier ohne Einschränkung auf ein Fehlen der IgM-Antikörper-Aktivität im Sinne eines isolierten AMS geschlossen werden darf.

Insgesamt können beim Verdacht eines Fehlens von IgM im Rahmen eines AMS aus der Zahl der Stufen, die der Endtiter nach Hitzeeinwirkung abfällt, folgende Schlüsse gezogen werden: Fällt der Titer um 2-3 Stufen ab, so sind mit Si-

cherheit normale Konzentrationen von Antikörpern des Typs IgM vorhanden. Bei Titerverlusten mit 4 und mehr Stufen ist ein übermäßig hoher IgM-Anteil anzunehmen, der bei einem Gesamttiter im Bereich der Norm den Verdacht eines funktionellen Defekts im IgG- und/oder IgA-Bereich erwecken muß. Die Feststellung eines Abfalls um 1 Stufe (untere Grenze der Norm) sollte Grund zur Wiederholung des Tests sein, um technische Unzulänglichkeiten auszuschließen. Gleiches gilt im Falle eines gleichbleibenden Titters. Bleibt der Abfall wiederum aus, so kann angesichts der Empfindlichkeit des Agglutinations-Tests ein Fehlen der Antikörper-Aktivität innerhalb der IgM-Fraktion mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden.

Beim Verdacht eines Mangels oder Fehlens der Antikörper vom Typ IgG lassen sich mittels präparativer Elektrophorese Antikörper der IgG-Fraktion von denen der IgA- und IgM-Fraktionen abtrennen (Fr. 3-5) und in der Hämagglutinationsreaktion getrennt erfassen. Für IgA und IgM ist eine Differenzierung auf diese Weise jedoch nicht möglich. Daß im Anschluß an die elektrophoretische Trennung die IgM zusammen mit der IgA-Aktivität relativ gering war (Tab. 8) im Vergleich zu den Befunden nach Wärme-Inaktivierung, erklärt sich aus der vergleichsweise geringen Stabilität der IgM-Moleküle gegenüber den mit dem Trennungsprozeß verbundenen Einwirkungen.

Die mit den genannten Methoden ausgeführte Bestimmung der Agglutinin-Aktivitäten von IgM (Wärme-Inaktivierung) und IgG (nach präparativer Elektrophorese) ist technisch relativ einfach ohne großen Aufwand durchführbar und somit auch für diagnostische Zwecke geeignet. Allerdings wird nur eine der Gamma-Globulin-Komponenten bestimmt, der IgA-Anteil allein kann nicht erfaßt werden.

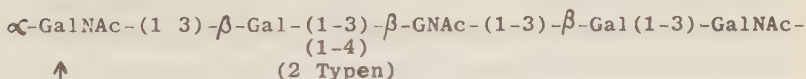
Zur isolierten Testung aller 3 Immunglobuline in einem einzigen Versuchsprozeß sind prinzipiell zwei Möglichkeiten gegeben. Einmal können die drei Immunglobuline des Serums rein dargestellt und in dieser Form zur Isoagglutinin-Bestimmung mittels Hämagglutination dienen. Diese Methode wurde von mehreren Autoren angewendet (ISHIZAKA 1965, RAWSON und ABELSON 1960, FRANKLIN 1959 und 1962 sowie COOMBS 1965). Nachteilig ist aber nicht nur der große Arbeitsaufwand, der dieses Verfahren für Routine-Untersuchungen ausschließt, sondern auch der bei der präparativen Arbeit unvermeidliche und nicht kalkulierbare Verlust an Antikörpern. Die von den Autoren genannten Ergebnisse über die Isoagglutinin-Aktivitäten in den 3 Fraktionen stimmen teilweise mit unseren Ergebnissen überein. So finden COMBBS (1965) und ISHIZAKA (1965) in allen Seren der BG O, A und B für die 19S-Globuline stärkere oder gleichstarke Aktivitäten im Vergleich zu den 7S-Globulinen. Dagegen fanden RAWSON und ABELSON (1960) an Immunsereen, sowie FRANKLIN (1959 und 1962) in BG O vorzugsweise IgG und in den BG A und B vorzugsweise IgM.

Der anderen Möglichkeit, spezifische Isolierung der Isohämagglutinine mit einem Immunabsorbens aus dem Serum und ihre Bestimmung nach Elution, wurde im 2. Teil dieser Arbeit nachgegangen. Hier sollte der Versuch unternommen werden, die absolute Menge der Antikörper, getrennt nach den drei Klassen, zu ermitteln.

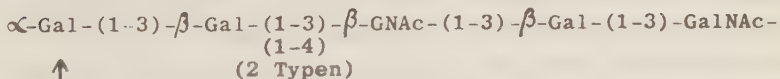
Zur Entwicklung einer brauchbaren Methode wurde folgender Versuchsablauf vorbereitet: Quantitative Absorption der Isohämagglutinine aus dem Serum auf serologischem Wege, Desorption der isolierten Antikörper, Bestimmung der Titer-Aktivität im Reihenverdünnungs-Test bzw. Bestimmung der einzelnen Gamma-Globulin-Komponenten mittels monospezifischer quantitativer radialer Immunodiffusion.

Als spezifisches Immunoabsorptions-Material für Isoagglutinine kommen AB-Substanzen, Erythrozyten-Stroma und Erythrozyten in Frage. Erythrozyten selbst verwendeten wir nicht, da im Verlauf der Desorption mit dem Eintreten einer Hämolyse zu rechnen war, und überdies mit dem Stroma ein Antigen in höherer Konzentration vorliegt. Die verwendeten kommerziellen AB-Substanzen und Stroma sind hinsichtlich der chemischen Struktur der bindenden Gruppen nicht mit Sicherheit als identisch zu bezeichnen. Die aus Mucosa gewonnenen AB-Substanzen sind wasserlösliche Mucopolysaccaride (Glycoproteine), deren chemischer Aufbau aufgeklärt wurde (LEHR'S 1930, MORGAN 1959, WATKINS 1962 und 1966, MARCUS und CASS 1968). A- und B-Substanzen unterscheiden sich nur in einem Zuckermolekül.

A-Substanz



B-Substanz



GalNAc = N-Acetyl-D-Galactosaminopyranose,

Gal = D-Galactopyranose,

GNac = N-Acetyl-D-Glucosaminopyranose

nach WATKINS (1966).

Bei der wasserunlöslichen AB-Substanz der Erythrozyten handelt es sich um Glycolipide, deren Einzelbestandteile zwar analysiert (KLENK und LAUENSTEIN 1951, 1952, YAMAKAWA 1953, KOSCIELAK 1963, WATKINS 1966), deren Strukturformeln aber noch nicht aufgeklärt wurden.

In unseren Versuchen trat mit den beiden zur Verfügung stehenden kommerziellen AB-Substanzen keine Präzipitation ein. In beiden Fällen handelt es sich um partiell gereinigte, wahrscheinlich relativ niedermolekulare Präparate, die somit zur Präzipitation nicht befähigt sind.

Der Versuch, aus Stroma nach den Angaben von GREEN (1967) eine präzipitierende AB-Substanz mit Duodecylsulfat-Na zu gewinnen, führte nicht zum Erfolg. Die mit der gewonnenen Substanz im Geldiffusions-Test auftretenden Linien verschwanden wieder beim Auswaschen in physiologischer NaCl-Lösung und müssen somit als unspezifisches Phänomen betrachtet werden. Es lag danach nahe, Erythrozyten-Stroma als Absorptions-Material zu verwenden. Ohne Mühe können größere Mengen davon in Form leicht sedimentierbarer Teilchen gewonnen werden. Die Absorption erfolgte in den entscheidenden Versuchen so vollständig, daß im Überstand keine Agglutinine mehr nachweisbar waren. Die Möglichkeit einer Desorption auf thermischem Wege bei 50°C beruht auf der Feststellung, daß die Hämagglutinations-Reaktion ein exothermer Vorgang ist (FILITTI-WURMSER 1954 und 1957, HUMMEL 1961). Die Methode, durch Zufuhr von Wärme Agglutinine von Stroma abzutrennen, wurde erstmals von LANDSTEINER und MILLER (1925) beschrieben ("LANDSTEINER-Methode") und oft angewendet (zuletzt ECONOMIDOU 1967). Wir wählten diese Technik, da wir sie für schonender hielten, besonders im Hinblick auf die empfindlichen IgM-Moleküle, als die Elution im sauren Milieu (KUNKEL und ROCKEY 1963, BRETON und GORIUS 1954, KIDD 1949, LANDSTEINER und v.d. SCHEER 1936) oder mittels erhöhter Salzkonzentration (KABAT und BEZER 1945). Der Versuch, die thermische Dissoziation mit einer Immunelektrophorese zu verbinden (MILGROM 1965), gelang nicht, da sich die Temperatur durch die im Agar entstehende zusätzliche Erwärmung nicht auf gleichbleibender Höhe einstellen ließ. Dagegen erwies

sich die Kombination von Wärmetrennung mit einer AGD nach OUCHTERLONY als ein sehr gut funktionierendes System, besonders deshalb, weil die in den Agar diffundierten Antikörper bei Abkühlung keine erneute Bindung mit Stroma eingehen konnten. Insofern ist das Verfahren gut zur Trennung und Charakterisierung der Isoagglutinine geeignet. Bei der Untersuchung der abgespaltenen Proteine zeigt sich jedoch, daß von Stroma auch eine Reihe anderer Serumproteine gebunden werden. Da zum quantitativen Nachweis der 3 Isoagglutinin-Klassen die absolute Reinheit der gewonnenen Hämagglutinine gefordert werden muß, besteht die Notwendigkeit, eine unspezifische Bindung anderer Immunglobuline an Stroma beim Absorptions-Vorgang zu verhindern oder die Desorption unter Bedingungen durchzuführen, die nicht gleichzeitig die Abtrennung unspezifischer fixierter Serumproteine bewirken. In der Literatur finden sich Arbeiten, die an der Tatsache vorbeigehen, daß Erythrozyten-Membranen außer Agglutininen auch andere Serumproteine binden. ECONOMIDOU (1967) absorbiert Formalin-behandelte Human- A- und B-Erythrozyten, wäscht die Zellen bei 4° C und eluiert durch Erwärmung auf 56° C in NaCl-Lösung mit Rinder-Serum-Albumin. TÖNDER und MILGROM (1966) eluieren von absorbiertem Stroma ebenfalls ohne Kontrolle, daß das Eluat tatsächlich nur Isoagglutinine enthält. Auch die von LANDSTEINER und v.d. SCHEER (1936) verwendete Methode der Ph-Erniedrigung (absorbiertes Azostroma mit in Essigsäure-Lösung) kann das Problem der Protein-Verunreinigung nicht lösen.

Mit der Frage der Adsorption unspezifischer Serum-Proteine an Erythrozyten und Stroma beschäftigten sich besonders KLEINE (1960), SPIELMANN (1960), JONES und GARDNER (1962) sowie MÜLLER und GRAMLICH (1964, 1965, 1966), die vor allem die gebundenen Protein-Mengen bestimmten. Zur Frage

der Hämagglutininisolierung mit Stroma, die von den Autoren nicht berührt wurde, ist deren Angabe bedeutungsvoll, daß Gamma-Globuline eine besonders starke Affinität zu Stroma besitzen und zwar nach MÜLLER und GRAMLICH (1966) eine 10mal größere als Albumin. Zum anderen wird berichtet von der Schwierigkeit, Stroma (bzw. Erythrozyten) wirklich proteinfrei zu waschen. Bei unseren Versuchen konnten selbst nach 6-maligem Waschen noch Serum-Proteine im OUCHTERLONY-Test nachgewiesen werden. Während FIDALGO (1967) angibt, Erythrozyten mit physiologischer NaCl-Lösung proteinfrei gewaschen zu haben, ohne aber Angaben über die hierzu notwendigen technischen Voraussetzungen zu machen, findet GRAMLICH (1965 und 1966) noch nach 11 Waschvorgängen markiertes Protein im Überstand. Er äußert (1967) die Ansicht, daß Stroma mit physiologischer NaCl-Lösung nicht restlos von Serum-Proteinen zu reinigen ist.

Wir fanden zwei Methoden, mit denen Stroma so weit gereinigt wurde, daß sich im OUCHTERLONY-Test nach Wärmetrennung keine Proteine mehr darstellten. Nach der einen Methode wird Stroma der Einwirkung einer 3%igen Papainlösung ausgesetzt, nach der anderen wird auf thermischem Wege (65° C) Stroma von Serumproteinen befreit. Beide Stroma-Präparate boten somit primär die Möglichkeit zur Reindarstellung von Isoagglutininen, beide aber nahmen beim Desorptionsprozeß auch unspezifische Gammaglobuline auf, welche durch Auswaschen nur teilweise entfernt werden konnten. Über die Art der unspezifischen Bindung von Serumproteinen an die Erythrozyten-Membran liegen bisher in der Literatur keine ausreichenden Informationen vor. HUMMEL (1961) und GRAMLICH (1966) stellten lediglich fest, daß die Hämagglutinin-Bindung der Langmuir-Isotherme gehorcht (LANGMUIR 1917, WOLF 1959). Diese setzt einheitliche Gruppen voraus, die rezeptiv reagieren, während die Bindung unspezifischer Proteine im Sinne der Freundlich-Isotherme

(FREUNDLICH 1930), also wahrscheinlich durch uneinheitliche Gruppen adsorptiv erfolgt. Der Versuch, mit der Substanz N-Acetyl-Galactosamin selektiv die Desorption der Agglutinine zu bewirken, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Auch bei niedrigen Temperaturen und starker Stromakonzentration ist die gleichzeitige Dissoziation der unspezifischen Gamma-Globuline nicht zu vermeiden.

Weiter wurde versucht, durch Veränderung der Reaktionsbedingungen zunächst eine gezielte Desorption der unspezifischen Gamma-Globuline zu bewirken unter Erhaltung der Agglutinin-Bindung. Durch Erhöhung der Ionenstärke und der Temperatur, Erniedrigung des PH-Wertes, Verlängerung der Zeitdauer sowie zunehmender Verdünnung in physiologischer NaCl-Lösung (GRAMLICH 1966) soll die Abtrennung unspezifischer Proteine begünstigt werden. Wie der von uns unternommene Versuch in dieser Richtung zeigte, führt ein solches Vorgehen stets auch zur Abspaltung gewisser Mengen von Isoagglutininen, was selbst bei optimalen Bedingungen nicht zu vermeiden ist. Auch auf diesem Wege erscheint somit eine quantitative Bestimmung der Isoagglutinine mittels radialer Immunodiffusion nicht möglich.

Unser Ziel einer nach Immunglobulin-Klassen getrennten quantitativen Bestimmung von Isohämagglutininen in absoluten Mengen und damit unbeeinflusst von ihrer unterschiedlichen Avidität zum Antigen konnte unter diesen Umständen keiner endgültigen Lösung zugeführt werden. Immerhin haben unsere Ergebnisse gezeigt, daß der entscheidende Schritt, nämlich die quantitative und zugleich reine Isolierung der Agglutinine, vermutlich nur mittels einer an eine Matrix gebundenen Blutgruppensubstanz realisiert werden kann. In diese Richtung weist der Versuch von KAPLAN und KABAT (1966), die eine AB-Substanz an N-carboxy-L-Leucin koppeleten. Sie berichten jedoch, daß im Eluat Spuren von Albumin enthal-

ten waren, ein Hinweis darauf, daß auch in diesem Falle die Gefahr einer unspezifischen Fixierung von Gamma-Globulinen nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann.

Ist das Problem der Agglutinin-Isolierung einmal gelöst, wären im Verlauf der Untersuchung noch folgende Schritte erforderlich: Zunächst eine quantitative, möglichst schonende Rückgewinnung der Antikörper etwa durch thermische Dissoziation wie bereits erörtert und schließlich die getrennte Bestimmung mittels monospezifischer Antiseren gegen die 3 Immunglobuline in der radialen Immunodiffusion. In Anbetracht der geringen Hämagglutinin-Konzentration im Serum einerseits und der allen Präzipitations-Testen eigentümlichen mäßigen Empfindlichkeit andererseits dürften für eine solche Untersuchung wenigstens 10ml Serum erforderlich sein.

Weitere Untersuchungen waren schließlich einem anderen Verfahren gewidmet, welches ebenfalls geeignet erscheint, eine quantitative Charakterisierung von Isohämagglutininen verschiedener Immunglobulinklassen herbeizuführen. Bei der Untersuchung der 3 Agglutinin-Fraktionen in der gewonnenen Protein-Lösung verwendeten wir ein Test-System auf der Grundlage des COMMBS-Prinzips, bei dem mit Isoagglutinin unerschwerlich beladene Erythrozyten mit monospezifischen Anti-Human-Gammaglobulin-Seren vom Kaninchen inkubiert und auf Agglutination getestet wurden. Auf gleicher Grundlage lassen sich auch Isoagglutinine aus Serum untersuchen. Gesamt-Agglutinine wurden auf diesem Wege mit kommerziellem COOMBS-Serum von verschiedenen Untersuchern (ISHIZAKA 1965, RAWSON und ABELSON 1960, GRUNDBACHER 1967) semiquantitativ bestimmt (in Titerwerten). Über die Verwendung von monospezifischen Seren liegen dagegen noch keine Angaben vor. Wie unsere Untersuchungen zeigten, sind Anti-Human-Gammaglobulin-Seren nicht identisch mit "COOMBS-Seren", da die

Anti-Human-Gammaglobulin-Seren vom Kaninchen bereits mit nativen Human Erythrozyten eine starke Reaktion im Sinne einer Verklumpung eingehen. Über das Zustandekommen dieser Reaktion finden sich in der Literatur keine Hinweise. COOMBS und RACE (1945 und 1947) stellten lediglich fest, daß das Kaninchen Antiserum "mit einer Mischung von A-, B und O Zellen und besser auch mit Zellen, die für den Test benutzt werden" (1947), absorbiert werden muß, um für den COOMBS-Test geeignet zu sein. Im übrigen ergibt sich aus dieser Forderung und der Feststellung, daß native Blutkörperchen durch Auswaschen nicht völlig von Gamma-Globulinen befreit werden können, eine serologisch unübersichtliche Situation, welche die Frage aufwirft, warum das noch fixierte Gammaglobulin bei seiner Reaktion mit dem homologen Antikörper im Serum keine Agglutination bewirkt (GROB und FROMMEL 1967).

Auch hier bedarf es somit zunächst noch grundlegender Untersuchungen. Weiterhin ist es notwendig, die Antikörper-Konzentration monospezifischer Antiseren in Verdünnungsreihen zu testen und zu standardisieren. Damit wird eine Endtiter-Bestimmung möglich, die wiederum unter Berücksichtigung der zur unterschwelligen Sensibilisierung benötigten Verdünnung des Probadens-Serums eine quantitative Aussage über den Isohämagglutinin-Gehalt in den 3 Immunglobulin-Klassen zuläßt.

Im Hinblick auf die große praktische Bedeutung, der eine möglichst exakte und differenzierte Beurteilung der Leistungsfähigkeit des humoralen Abwehrsystems zukommt, erscheint es lohnend, die sich aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen abzeichnenden Wege weiter zu verfolgen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Untersuchungen war es, die Gesamt-Aktivitäten der Isohämagglutinine der Blutgruppen A, B und O zu bestimmen und zu vergleichen, und Aufschluß darüber zu erhalten, wie groß die Anteile der 3 Gammaglobuline IgA, IgG und IgM, denen die Isoagglutinine angehören, an der Gesamt-Agglutinin-Aktivität sind.

Im Reihenverdünnungs-Test an 90 Seren der BG A, B und O zeigten die Agglutinine Anti-A der beiden BG B und O statistisch gleiche mittlere Hämagglutinations-Aktivitäten, ebenso die Agglutinine Anti-B der beiden BG A und O (Mittelwertvergleich). Die Anti-A-Endtiter der BG B und O gruppierten sich um Mittelwerte, die zwischen 1:64 und 1:128 lagen, für Anti-B der BG A und O ergaben sich Mittelwerte in der Umgebung des Titors 1:32. Auf statistischem Wege wurde gezeigt, daß Anti-A eine signifikant höhere Agglutinin-Aktivität aufweist als Anti-B, sowohl in BG O als auch beim Vergleich der BG A und B.

Bei der Untersuchung über eine Altersabhängigkeit des Hämagglutinin-Titors wurde nur ein leichter Abfall bis zum 60. Lebensjahr, danach ein steiler Rückgang beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Personen ließen sich aus unseren Ergebnissen nicht ablesen.

Nach Inaktivierung des IgM-Anteils durch Erhitzen auf 65° C sank der Endtiter in allen drei BG in der überwiegenden Anzahl der Seren um 1-3 Stufen ab. Für die drei BG konnte statistisch ein gleicher Anteil der IgM-Aktivität nachgewiesen werden. Der Titerabfall (IgM-Anteil) ist unabhängig von der Höhe des Ausgangstiters.

Für die Bestimmung der Antikörper-Aktivitäten der drei Gamma-Globulin-Fraktionen zur Diagnostik partieller Antikörper-Bildungs-Störungen im Rahmen des Antikörper-Mangel-Syndroms eignet sich die genannte Methode zur Abgrenzung der IgM Antikörper von IgG und IgA. Über die präparative Elektrophorese kann die IgG-Aktivität von denen der IgA und IgM Fraktionen abgetrennt werden.

Um über semiquantitative Aussagen hinaus die drei Anteile der Isoagglutinine quantitativ exakt zu bestimmen, wurden verschiedene Experimente zur Entwicklung einer einwandfreien Technik zur Reindarstellung der Isohämagglutinine durchgeführt, wobei zunächst die Suche nach einem geeigneten Absorptionsmaterial im Vordergrund stand. Die verwendeten kommerziellen AB-Substanzen erwiesen sich dazu als ungeeignet, da sie mit Hämagglutininen nicht präzipitierten. Duo-dezyl-Sulfat-Na behandeltes Stroma-Material zeigte nicht die notwendigen Voraussetzungen, um als spezifisches Immunoabsorbens für Isoagglutinine verwendet werden zu können. Erythrozyten-Stroma absorbiert die Agglutinine nahezu vollständig aus Serum. Vom Stroma-Agglutinin-Komplex ließen sich die Hämagglutinine abtrennen und in der Agglutinations-Reaktion nachweisen. Zur Desorption wurde eine Methode entwickelt, die eine Kombination von Wärmetrennung (52°C) und AGD-Technik nach OUCHTERLONY darstellt. Wie sich bei der Untersuchung der gewonnenen Protein-Lösung zeigte, adsorbiert Stroma auch beträchtliche Mengen von Albumin, Transferrin und Gammaglobulinen ohne Isoagglutinin-Spezifität. Versuche zur Beseitigung der Affinität von Stroma zu den unspezifischen Gammaglobulinen (fermentative Vorbehandlung des Stromas) sowie Versuche zur selektiven Abspaltung der Agglutinine (mit N-Acetyl-Galactosamin) brachten nicht den gewünschten Erfolg der Reindarstellung. Infolge dieser bislang nicht überwundenen Schwierigkeit war die angestrebte

quantitative Bestimmung der Isohämagglutinine mittels monospezifischer radialer Immunodiffusion nicht möglich.

Zur primären Reinigung des Erythrozyten-Stromas von Serumproteinen wurden zwei zuverlässige Methoden gefunden: die thermische Abspaltung bei einer Temperatur von 60° C und die fermentative Behandlung des Stromas mit 3%iger Papainlösung. Beide Verfahren bleiben ohne Einfluß auf die Absorption von Isohämagglutininen, vermögen aber die gleichzeitige unspezifische Anlagerung von Gammaglobulinen, die durch Auswaschen nicht quantitativ rückgängig gemacht werden kann, nicht zu verhindern.

Ein weiterer Weg zum semiquantitativen Nachweis der drei Isoagglutinin-Anteile wurde unter Anwendung des Anti-Globulin-Tests nach COOMBS mit monospezifischen Antiseren versucht. Hierzu bedarf es zunächst noch weiterer Untersuchungen zur Absorption. Ein bisher nicht untersuchter, Human-Erythrozyten agglutinierender Faktor im Kaninchen-Serum muß aus den drei monospezifischen Antiseren vom Kaninchen absorbiert werden und ein standardisiertes Testsystem entwickelt werden.

L i t e r a t u r

1. Bessis, M., Breton-Gorius, J., Eluation des anticorps à partir de cellules osmiques, Compt. rend. soc. biol. 148, 209, 1954
2. Claus, G., Ebner, H., Grundlagen der Statistik. Volk und Wissen Verlag, Berlin 1967
3. Cohn, E.J., Oncley, J.L., Strong, L.E., Hughes, W.I., Armstrong, S.H., Chemical, clinical and immunological studies on the product of human plasma fractionation. J. clin. Invest. 23, 417, 1944
4. Cohn, E.J., Blood proteins and their therapeutic value. Science 101, 51, 1945
5. Coombs, R.R.A., Mourant, A.E., Race, R.R., A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Brit. J. Exper. Path. 25/26, 255-266, 1944/45
6. Coombs, R.R.A., Mourant, A.E., On certain properties of antisera prepared against human serum and its various protein fractions: their use in the detection of sensitisation of red cells with "incomplete" Rh antibody, and on the nature of this antibody. J. Pathol. Bacteriol. 59, 105-III, 1947
7. Coombs, R.R.A., Franks, D., Gurner, B.W. et al., Studies on mixed agglutination with special reference to the A-antigen and the physical properties of the operative antibodies. Immunology 8, 182-192, 1965
8. Dittebrandt, M., Application of Weichselbaum biuret reagent to determination of spinal fluid protein. Amer. Clin. Path. 18, 439 (1948)

9. Deutsch, H.F., Albery, R.A., Gosting, L.J. and Williams, J.W., Biophysical studies of blood plasma proteins. VI, Immunological properties of Gamma-1-Globulins from the plasma of normal humans. J. Immunol. 56. 183, 1947
10. Economidou, J., Hughes-Jones, N.C., Gardner, B., The functional activities of IgG and IgM Anti-A and Anti-B, Immunology 13, 227-234, 1967
11. Fidalgo, B.V., Katayama, Y., Najjar, V.A.. The physiological role of the lymphoid system. V. The binding of autologous (erythrophilic) gamma-globulin to human red blood cells. Biochem. 6, 3378-85, 1967
12. Filitti-Wurmser, S., Jacquot-Armand, Y. et al., Physico-chemical study of human isohaemagglutination. Ann. Eugen. 18, 183, 1954
13. Filitti-Wurmser, S., Jacquot-Armand, Y. et. al., Thermodynamic studies of the isohaemagglutinins. Progr. Biophys. 7, 88, 1957
14. Filitti-Wurmser, S., Wurmser, R., Les études quantitatives de l' isohémagglutination. Acta Haemat. 36, 239-255 1966
15. Freundlich, H., Kapillarchemie, 4. Aufl. Bd. 1, Leipzig 1930
16. Foerster, O., Quantitative Untersuchungen über die agglutinierende und bactericide Wirkung des Blutserums von Thyphuskranken und -Reconvalescenten, Z. Hyg. 24: 500 (1897)
17. Franklin, E.C., The structure, funktion and significance of the immune globulins. Vox Sang. 7, 1-8, 1962
18. Franger, W., Cheikh-Ali, H., Untersuchungen zur Frage einer Beeinflussung der menschlichen Isoagglutinine durch Nebennierenrinden-Steroide, Röntgen-Strahlen und antiinflammatorische Mittel. Zschr. f. Immunitätsf. 132, 295-301, 1967

19. Fudenberg, H.H., Kunkel, N.G., Franklin, E.C., High molecular weight antibodies. Proc. VIIth Congr. Int. Soc. Blood Trans., L. Holländer Ed., p 522 (Karger, Basel) 1959
20. Grabar, P., Williams, C.A., Methode immuno-electrophoretique d'analyse de melanges de substances antigeniques. Biochem. Biophys. Acta (Amsterdam) 17, 67 (1955)
21. Gramlich, F., Die Rezeptorfunktion der Erythrozyten. Bibl. Haemat. Fasc. 25, 1966
22. Green, F.A., Studies on the Rh (D7) Antigen. Vox Sang. 10: 32-53 (1965)
23. Green, F.A., Disaggregated human erythrocyte membranes and blood group activity. J. Immunol. 99: 56-60 (1967)
24. Greenbury, C.L., Moore, D.H., Nunn, L.A.C., Reaktion of 7S and 19S components of immune rabbit antisera with human A and AB red cells. Immunology 6, 421-433, 1963
25. Greendyke, R.M., Swisher, S.N., Quantitative studies of hemagglutination. Use of an electronic particle counter to investigate factors influencing cell aggregation. Vox Sang. 15, 321, 1968
26. Grob, P.J., Frommel, D. et al., Interaction of IgG and its fragments with red cells. Immunology 13, 489-499, 1967
27. Grönwall, A., Über die Verteilung der Isoagglutinine in durch Elektrophorese fraktionierten Blutseren. Biochem. Zschr. 282, 257, 1935
28. Grundbacher, F.J., Quantity of hemolytic anti-A and anti-B in individuals of a human population: correlations with isoagglutinins and effects of the individuals' age and sex. Zschr. f. Immunitätsf. 134, 317-349, 1967

29. Hummel, K., Energetische Betrachtungen zur Antigen-Antikörper-Bindung. Zschr. f. Immunitätsf. 122, 1961
30. Hummel, K., Götze, O., Quantitative Studien über die Bindungs- und Agglutinationsfähigkeit von A-Immunkörpern des G- und M-Typs bei verschiedener Temperatur (4° , 37° C), Zschr. f. Immunitätsf. 131, 50-80, 1966
31. Hummel, K., Zur Theorie der thermischen Abhängigkeit hämagglutinierender Systeme, Ärztl. Lab. 12, Nr. 6, 1964-175, 1966
32. Hummel, K., Osmialowski, A. und Schneider, R., Quantitative Untersuchungen über die Heterogenität der gegen A und Rh (O) gerichteten Hämagglutinine in menschlichen Seren. Zschr. f. Immunitätsf. 134, 181-204, 1968
33. Hölscher, F., Untersuchungen über den Blutgruppentiter bei fortgeschrittener Tuberkulose. Zschr. f. Immunitätsf. 66, 193-203, 1930
34. Ishizaka, K. and T., Lee, E.H., Fudenberg, H., Immunological properties of human γ A isohemagglutinin. I. Comparisons with γ G and γ M-Globulin antibodies. J. Immunol. 95, 197, 1965
35. Ishizaka, K. and T., Lee, E.H., Fudenberg, H., Immunological properties of human γ A isohemagglutinin. II The effect of Reduction and alkylation. J. Immunol. 95, 771, 1965
36. Isliker, H.C., Purification of antibodies by means of antigens linked to ion exchange resins, Ann. New York Acad. Sc. 57, 225, 1953
37. Jones, N.C.H., Gardner, B., The exchange of ^{131}J -labelled lipid and ^{131}J -labelled protein between red cells and serum. Biochem. J. 85, 466, 1962

38. Johnson, G.D. and Holborow, E.J., Heat stability of antinuclear factor in systemic lupus erythematosus. *Lancet* II, 663, 1961
39. Kabat, E.A., Bezer, A.E., Immunochemical studies on blood groups. Estimation of A and B isoantibodies in human serum by the quantitative precipitin method. *J. Exper. Med.* 82, 207, 1945
40. Kaplan, M.E. and Kabat, E.A., Studies on human antibodies, *J. Exper. Med.* 123, 1061 (1966)
41. Kidd, P., *J. Clin. Pathol.* 2, 103, 1949, zit. nach Kabat, E.A., *Blood Group Substances*, Academic Press New York 1956, S. 66
42. Klenk, E., Lauenstein, K., Über die zuckerhaltigen Lipotide der Formbestandteile des menschlichen Blutes, *Zschr. Physiol. Chem.* 288, 220, 1951
43. Klenk, E., Lauenstein, K., Über die zuckerhaltigen Lipotide des Erythrozytenstromas von Mensch und Rind, *Zschr. Physiol. Chem.* 291, 249, 1952
44. Kleine, N., Über den Verlauf der Adsorptionsisotherme und der Desorption von Plasmaeiweiß bei gelagerten Erythrozyten. *Ber. 9. Tag. dtsh. Ges. Bluttransf. Braunschweig*, 1960, *Bibl. Haemat.* vol. 12, pp. 105-110
45. Kochwa, S. and Rosenfield, R.E., Immunochemical studies of the Rh system, I. Isolation and characterization of antibodies, *J. Immunol.* 92, 682-692, 1964
46. Kościelak, J., Bloodgroup A specific glycolipids from human erythrocytes, *Biochemica et Biophysica Acta* 78, 313-328, 1963
47. Kunkel, H.G. and Rockey, J.H., β_2A and other immunoglobulins in isolated anti-A antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 113, 1963, 278

48. Landsteiner, K., Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Zbl. Bakteriologie 27, 357, 1900
49. Landsteiner, K., Miller, C.P., Serological studies on the blood of the primates. II. The blood groups in anthropoid apes., J. Exper. Med. 42, 853 (1925)
50. Landsteiner, K., van der Scheer, J., On cross reaction of immune sera to azoproteins. J. Exper. Med. 63, 325, 1936
51. Langmuir, J., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. J. Amer. Chem. Soc. 39, 1848, 1917
52. Lehrs, H., Über gruppenspezifische Eigenschaften des menschlichen Speichels, Zchr. f. Immunitätsf. 66, 175, 1930
53. Marcus, D.M., Cass, L.E., Studies of blood group substances, IV. Caprine IgG and IgM Antibodies to human-H Substances, J. Immunol. 101, 669-678, 1968
54. McDuffy, F.C., Kabat, E.A., Allen, P.Z., Williams, C.A., An immunochemical study of the relationship of human blood group isoantibodies to γ_1 and γ_2 globulins. J. Immunol. 81, 1958, 48
55. Milgrom, F., Tuggac, Z.M., Campbell, W.A., Analysis of Antigen-Antibody complexes by immunoelectrophoresis. Immunology, 8, 406-410, 1965
56. Mollison, P.L., Blood transfusion in clinical medicine 3rd. ed. (Oxford, Blackwell 1961)
57. Morgan, W.T., Chemische Grundlagen der menschlichen Blutgruppenspezifität. Naturwissenschaften 46, 181, 1959

58. Müller, H.E., Gramlich, F., Die Zusammensetzung des Plasma-proteinfilmes an der Oberfläche menschlicher Erythrozyten bei verschiedenen Krankheitsbildern. Blut, 10, 135, 1964
59. Müller, H.E., Gramlich, F., Über den Plasmaproteinfilm an der Oberfläche menschlicher Erythrozyten. Acta Haemat. 34, 239-249, 1965
60. Newcomb, R.W., Normansell, D., Stanworth, D.R., A structural study of human exocrine IgA globuline. J. Immunol. 101, 905, 1968
61. Nijenhuis, L.E., Bratlie, K., ABO Antibodies in twins. Vox Sang. 7, 236-238, 1962
62. Onoue, K., Kishimoto, T., Yamamura, Y., Structure of human immunoglobulin M. J. Immunol. 100, 238, 1968
63. Ouchterlony, Ö., Diffusion in gel methods for immunological analysis and their application to problems concerning allergy. In Proc. 11th Int. Congr. Dermat. Stockholm 1957, Vol. 3, 564, Acta Derm.-Vener. (1960)
64. Pedersen, K.O., Ultracentrifuge studies on serum and serum fractions, Almquist and Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, 1945
65. Pothmann, F.J., Grün, L., Über Isoagglutinine und Schick-Reaktionen Erwachsener, Zschr. f. Immunitätsf.
66. Rawson, A.J., Abelson, N.M., Studies of blood group antibodies. I. Fractionation of Anti-A and Anti-B isohemagglutinines by anion-cation cellulose exchange chromatografie. J. Immunol. 82, 435, 1959
67. Rawson, A.J., Abelson, N.M., Studies of blood group antibodies. Physicochemical differences between isoanti-A, B and isoanti-A or isoanti-B. J. Immunol. 85, 640-647, 1960

68. Rawson, A.J. and Abelson, N.M., Studies of blood group antibodies, the blood group isoantibody activity of γ_1 AGlobulin. J. Immunol. 93, 192, 1964
69. Shaw, D.H., Stone, W.H., Seasonal variation of natural occurring isoantibodies of man. Programme, VI Cong. Europ. Soc. Hemat. Kopenhagen 1957
70. Schiff, F., Mendlowicz, L., Quantitative Untersuchungen über Isoagglutinine mit besonderer Berücksichtigung der Leukämie, Zschr. f. Immunitätsf. 48, 1-22 1926
71. Schierz, G., Fluoreszenzserologischer Nachweis von Antikernfaktoren am Leberschnitt. Ein Beitrag zum Problem der Autoimmun-Antikörper. Habilitationsschrift 1967
72. Solomon, J.M., Gibbs, M.B., Bowdler, A.J., Methods in quantitative hemagglutination. Vox Sang. 10: 54-72 (1965)
73. Spielmann, W., Das Eiweißbindungsvermögen von Erythrozytenstromata. Ber. 9. Tag dtsch. Ges. Bluttransf. Braunschweig 1960, Bibl. Haemat., vol. 12, pp. 298-313
74. Steffes, H., Untersuchungen zur Entwicklung der Isohämagglutinine in den ersten Lebensjahren, Inaugural-Dissertation, Universität München, 1966
75. Stone, W.H., The J substance of cattle. III Seasonal variation of the naturally occurring isoantibodies for the J substance. J. Immunol. 77, 369-376, 1956
76. Ströder, J., Vortrag rhein.-westf. Kinderärzte-Tagung Köln, April 1949, zit. nach Pothmann, F.J., Grün, L., über Schick-Reaktionen Erwachsener. Zschr. f. Immunitätsf. 106, 499, 1949

77. Thomsen, C., Kettel, K., Die Stärke der menschlichen Isoagglutinine und entsprechenden Bluthörperchenrezeptoren in verschiedenen Lebensaltern. Zschr. f. Immunitätsf. 63, 67-93, 1929
78. Tönder, O., Milgrom, F., Studies on agglutination by macromolecular antibodies. Agglutination by natural iso-antibodies. Vox. Sang. 11, 475-488, 1966
79. Tönder, O., Studies on agglutination by macromolecular antibodies. Vox Sang. 14, 241-254, 1968
80. Watkins, W.M., Changes in the specificity of blood-group mucopolysaccharides induced by enzymes from Trichomonas foetus. Immunology 5, 245, 1962
81. Watkins, W.M., Blood-group substances, Science 152, 172-181, 1966
82. Wildführ, G., Untersuchungen über den Isoagglutinititer des Menschen, Zschr. f. Immunitätsf. 105, 417-432, 1945
83. Wolf, K.L., Physik und Chemie der Grenzflächen, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959
84. Yamakawa, T., Suzuki, S., The chemistry of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. IV. Distribution of lipid-hexosamin and lipid-hematannic acid in the red blood corpuscles of various species of animals. J. Biochem. 40, 7, 1953
85. Yokoyama, M., Stegmaier, A., Epstein, W.L., Anti-A and anti-B antibodies in immune human sera, Zschr. f. Immunitätsf. 132, I-11, 1967
86. Zantop, H., Untersuchungen über den Blutgruppentiter bei Tuberkulose, Zschr. f. Immunitätsf. 68, 277-285, 1930

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. H. Eyer, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität München, der mir großzügig die Arbeit in seinem Institut ermöglichte.

Herrn Privatdozenten Dr. G. Schierz bin ich für die Themenstellung sowie für die freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Bei Fräulein K. v. Busch und Fräulein G. Deindl möchte ich mich für die wertvolle Hilfe bei der Einarbeitung in technische Verfahren der Serologie bedanken.

Lebenslauf

Am 2.4.1938 wurde ich als Sohn des Architekten Dipl.-Ing. Maximilian Heinsius von Mayenburg, seit 18.2.1945 im Osten vermißt, und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Riebold, in Dresden geboren.

Von 1944 bis 1952 besuchte ich die Grundschule in Höckendorf/Sachsen und in Dresden, anschließend die Oberschule Dresden-Nord in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung.

1955 wurde ich nach einem Probespiel der Staatskapelle Dresden als Cellist an dieses Orchester engagiert. Ich beendete vorzeitig meine Schulzeit und blieb Mitglied des Orchesters bis zum Weggang unserer Familie nach Westdeutschland im September 1958. Im Jahre 1959 studierte ich an den Musikhochschulen in Karlsruhe und West-Berlin.

Von 1960 bis 1961 besuchte ich die Robert-Blum-Schule in Berlin-Schöneberg (Oberschule wissenschaftlichen Zweiges), wo ich 1961 die Prüfungen für das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1961/62 bezog ich die Universität in Hamburg, um Medizin zu studieren. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im Oktober 1964 in Hamburg setzte ich das Medizinstudium in Göttingen und München fort.

Die ärztliche Prüfung schloß ich im August 1968 in München mit Erfolg ab.

Von September 1968 bis Mai 1969 war ich am Hygiene-Institut der Universität München als Medizinal-Assistent tätig, wo ich gleichzeitig die Untersuchungen für meine Dissertationsarbeit beendete.

Seit Mai 1969 arbeite ich als Medizinal-Assistent auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses München-Perlach.

Am 3.5.1968 schloß ich die Ehe mit Claudia H. von Mayenburg, geb. Morisse. Aus dieser Ehe ging der Sohn David hervor.

